THÈSES

PRÉSENTÉES

A LA FACULTÉ DES SCIENCES DE L'UNIVERSITÉ DE PARIS

POUR OBTENIR

LE GRADE DE DOCTEUR ÈS SCIENCES NATURELLES

PAR

Pierre DELAVEAU

1re THÈSE. — « Les polyphénols, en particulier les flavonoïdes de la grande capucine (Tropaeolum majus L) ».

2e THÈSE. — Propositions données par la Faculté.

« Les coumarines en physiologie végétale »

Soutenues le 6 février 1967 devant la Commission d'examen

MM. CHOUARD *Président*
ULRICH, PARIS *Examinateurs*

UNIVERSITÉ DE PARIS

FACULTÉ DES SCIENCES DE PARIS

Janvier 1966

PROFESSEURS

Doyen ..... M. ZAMANSKY

PRENANT	T	Anatomie et histologie comparée.
GRASSE	T	Evolution des êtres organisés.
PRÉVOST	T	Chimie organique.
WYART	T	Minéralogie et cristallographie
TEISSIER	T	Zoologie.
AUGER	T	Physique quantique et relativité.
MONNIER	T	Physiologie générale.
PIVETEAU	T	Paléontologie.
ROCARD	T	Physique E.N.S.
CARTAN	T	Mathématiques E.N.S.
LAFFITTE	T	Chimie générale.
N...	T	Géométrie supérieure.
COULOMB	T	Physique du globe.
Mlle COUSIN .	T	Biologie animale S.P.C.N.
CHRÉTIEN	T	Chimie minérale.
BOCQUET	T	Zoologie.
KASTLER	T	Physique E.N.S.
EPHRUSSI	T	Génétique.
GAUTHERET ..	T	Biologie végétale C.P.E.M.
LUCAS R.	T	Recherches physiques.
THOMAS A. ...	T	Biologie cellulaire.
MORAND	T	Physique enseignement.
SOLEILLET	T	Physique C.P.E.M.
FORTIER	T	Mécanique expérimentale des fluides.
DRACH	T	Zoologie.
QUENEY	T	Météorologie et dynamique de l'atmosphère.
GALLIEN	T	Embryologie.
EICHHORN	T	Botanique.
DE CUGNAC ..	T	Biologie végétale S.P.C.N.
Mlle CAUCHOIS	T	Chimie physique.
THELLIER	T	Physique du globe.
PONCIN	T	Mécanique générale.
DUBREIL	T	Arithmétique et théorie des nombres.
QUELET	T	Chimie organique.
CAGNIARD	T	Géophysique appliquée.
CHAMPETIER ..	T	Chimie macromoléculaire.
CUVILLIER	T	Micropaléontologie.
JUNG		Géologie.
TRILLAT		Microscopie et diffraction électronique.
WIEMANN	T	Chimie organique et structurale.
VASSY	T	Physique de l'atmosphère.
DESTOUCHES ..	T	Théorie physique.
AMIEL	T	Chimie générale.
HOCART	T	Minéralogie et cristallographie.
MATHIEU J.P. .	T	Physique optique.
COUTEAUX ...	T	Cytologie.
CHOQUET	T	Théorie des fonctions et topologie.
FELDMANN ...	T	Biologie végétale marine.
JOST	T	Physiologie comparée.
FORTET	T	Calcul des probabilités et physique mathématiques.
SCHWARTZ ...	T	Calcul différentiel et intégral.
CHOUARD	T	Physiologie végétale.
MALAVARD ...	T	Aviation (technique aéronautique).
BRELOT	T	Analyse supérieure.
NORMANT	T	Synthèse organique.
BENARD	T	Chimie appliquée.
DUGUE	T	Statistique mathématique.
SOULAIRAC ...	T	Psychophysiologie.
ULRICH	T	Physiologie végétale appliquée
KIRRMANN ...	T	Théories chimiques.
CHADEFAUD ..	T	Botanique.
Mlle LE BRETON	T	Physiologie de la nutrition.
LELONG	T	Application de l'analyse à la géométrie.
DEVILLERS	T	Anatomie et histologie comparées.
EHRESMANN ..	T	Topologie algébrique.
FRANÇON	T	Physique S.P.C.N.
GLANGEAUD ..	T	Géographie physique, géologie dynamique.
DODEMENT ...	T	Mathématiques M.G.P.
PISOT	T	Technique mathématique de la physique.
ROCH	T	Géologie.
SCHATZMANN..	T	Astrophysique.
TERMIER	T	Géologie générale.
ZAMANSKY ...	T	Mathématiques générales.
LENNUIER	T	Physique M.G.P.
ROUTHIER	T	Géologie appliquée.
Mme TONNELAT	T	Physique théorique.
DIXMIER	T	Mathématiques M.P.C.
SOUCHAY	T	Chimie générale.
AIGRAIN	T	Electrotechnique.
BRUSSET	T	Chimie systématique.
LEVY	T	Physique théorique des hautes énergies.
Mme CHAIX ..	T	Chimie biologique.
Mme HUREL PY	T	Biologie végétale C.P.E.M.
PANNETIER ...	T	Chimie générale I.
BRUN	T	Mécanique des fluides I.
Mme DUBREIL	T	Mathématiques (Agrégation).
Mme LELONG .	T	Mathématiques II E.N.S.
BELLAIR	T	Géologie S.P.C.N.
COTTE	T	Physique électricité.
DUBOIS J.E. ..	T	Chimie organique physique.
LAMOTTE	T	Zoologie E.N.S.
OLMER	T	Energétique générale.
GAUTHIER	T	Mécanique appliquée.
BARCHEWITZ .	T	Chimie physique.
BROSSEL	T	Physique atomique.
BUSER	T	Physiologie comparée.
CAMUS	T	Physiologie végétale.
CURIEN	T	Minéralogie et cristallographie
POSSOMPES	T	Zoologie.
PULLMANN ...	T	Chimie quantique.
TEILLAC	T	Physique nucléaire et radioactivité.
VILLE	T	Econométrie.
WILLEMART ...	T	Chimie C.P.E.M.
FREYMANN ...	T	Recherches physiques.
ROLLET	T	Chimie minérale.
Mlle JOSIEN ..	T	Chimie S.P.C.N.
CHEVALLEY ...	T	Géométrie algébrique et théorie des groupes.
GERMAIN	T	Mécanique théorique des fluides.
LUCAS G.	T	Géologie.
ALLARD	T	Chimie physique.
BERTHELOT ...	T	Physique des particules fondamentales.
BRICARD	T	Météorologie.
Mme ALBE-FESSARD	T	Psycho-physiologie.

UNIV. LEIDEN BIBL.

Physiol. Vég., 1967, **5** (4), 357-390.

Les flavonoïdes de la Grande Capucine *(Tropaeolum majus L.)*

Pierre DELAVEAU

Laboratoire de Matière médicale, Faculté de Pharmacie, 4 avenue de l'Observatoire, Paris VI^e^, France

(Manuscrit reçu le 5 mai 1967)

RÉSUMÉ

Les organes verts de la Capucine (*Tropaeolum majus* L.) contiennent divers polyphénols dont un acide chlorogénique et un triglucoside du quercétol. Celui-ci est très facilement hydrolysable en libérant de l'isoquercitroside. Dans les fleurs existe un glucoside du kaempférol.

Les limbes foliaires sont de loin les organes les plus riches en flavonoïdes. La répartition de ceux-ci au cours du développement est suivie, chez la variété naine « Globe écarlate » Vilmorin, par spectrophotométrie du chélate d'aluminium.

La quantité totale de flavonoïdes contenus dans une plante varie au cours de la croissance selon une courbe en S. La teneur en flavonoïdes, rapportée à 100 g de matière sèche, est maximale chez la jeune plantule. Chez celle-ci, un éclairement très faible par la lumière blanche suffit à déclencher la biogenèse des flavonoïdes. Le rôle du système du phytochrome est prouvé. Le proche U.V. a les mêmes effets que la lumière violet bleu. En réaction dite de haute énergie, la DL-phénylalanine marquée est mieux utilisée en lumière blanche enrichie de radiations ultra-violettes qu'en lumière verte.

Chez la plante adulte, la teneur en flavonoïdes varie dans le même sens que l'intensité de l'éclairement en lumière blanche.

Dans les feuilles en inanition, les flavonoïdes ne paraissent pas participer au métabolisme.

SUMMARY

In green parts of nasturtium (Tropaeolum majus *L.*) *exist some polyphenolics such a chlorogenic acid and a quercetol-triglucoside, the latter being very easily hydrolysable into isoquercitrin. Flowers contain a kaempferol glucoside.*

In leaves, particulary very young leaves, flavonoids are at the highest level. During development of plant the distribution of flavonoids is investigated spectrophotometrically, in the « Globe écarlate » Vilmorin cultivar. For a single plant the change is affecting a S-pattern and the highest level is obtained in the youngest seedling.

Flavonoid content is quantitatively depending upon light intensity while in seedling a very low energy is able to instigate biosynthesis of flavonoids. Phytochrome is concerned. Near U.V. light leads to the same effects as blue light does. In « high energy reaction » labelled DL-phenylalanin is better turned into flavonoid with white than with green light.

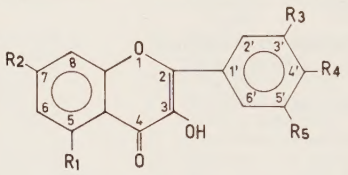
During dark stay of leaves flavonoids do not seem to enter into catabolic pathway.

---

(1) Ce travail constitue l'essentiel d'une Thèse de Doctorat d'Etat (Sc. nat.) présentée à la Faculté des Sciences de Paris en 1967 et qui porte le N° AO 1272 à l'enregistrement du Centre National de la Recherche Scientifique.

INTRODUCTION

Au cours d'une étude biochimique préliminaire, de l'isoquercitroside ou quercétol 3-glucoside (fig. 1) était isolé des feuilles de la Capucine (PARIS et DELAVEAU, 1961). La Grande Capucine dans sa variété naine « Globe écarlate » Vilmorin est un matériel favorable à une étude physiologique d'ensemble sur les hétérosides flavoniques.



	R1	R2	R3	R4	R5
Kæmpférol	OH	OH	H	OH	H
Quercétol	OH	OH	OH	OH	H
Myricétol	OH	OH	OH	OH	OH

FIG. 1. — Flavonols les plus fréquemment rencontrés chez les végétaux

A côté de l'isoquercitroside, ou Fv A, un second hétéroside Fv B est observé dans les tiges, les feuilles, les pédoncules floraux (DELAVEAU, 1965 *a*). D'importantes variations de teneur de Fv A et de Fv B s'observent au cours du développement de la Capucine (DELAVEAU, 1965, 1965 *b*). Au moyen de greffes croisées entre *Tropæolum majus* L. et *T. peregrinum* L., il est montré que la biogenèse des hétérosides a lieu dans les organes aériens (DELAVEAU, 1964).

A. LES FLAVONOIDES DE LA GRANDE CAPUCINE

A l'aide de la chromatographie sur papier, il est possible de reconnaître la présence de diverses substances polyphénoliques, fournissant des taches colorées à la lumière blanche ou ultra-violette, après traitement du chromatogramme au moyen de réactifs tels que la potasse, le chlorure d'aluminium ou de fer, ou des dérivés diazotés en solution alcoolique diluée.

Si des solvants banaux comme celui de PARTRIDGE (1946), désigné ici sous le signe S_1, ou l'acide acétique à 2 ou 15 % dans l'eau (S_2) ne permettent d'observer pratiquement qu'une seule tache de flavonoïde dans les limbes foliaires, l'emploi de l'eau (S_3) ou du mélange eau-alcool méthylique-dichlorométhane 40-10-1 V/V/V(S_4) rend évident la présence dans ces mêmes extraits d'un flavonoïde Fv B différent de l'isoquercitroside Fv A et beaucoup plus soluble dans l'eau que ce dernier. Nous verrons que Fv A est un artefact. Fv B est en fait l'hétéroside principal des limbes foliaires. Très labile, il est facilement hydrolysé par l'emploi des méthodes classiques initialement utilisées pour l'étude des extraits d'organes et

Abréviations

Fv A = Flavonoïde A = isoquercitroside = quercétol 3-glucoside.
Fv B = Flavonoïde B = quercétol 3-triglucoside ou quercétol 3-glucoside 7-diglucoside.
Fv C = Flavonoïde C = glucoside du kaempférol.

l'isolement de substances pures. Au cours de la dessiccation des limbes à l'air libre, ne paraît pas intervenir d'hydrolyse enzymatique. D'ailleurs aucun effet hydrolysant n'est mis en évidence par l'essai selon NGUYEN HIEP, DELAVEAU et PARIS (1964).

1. Préparation de Fv B

Après de très nombreuses tentatives infructueuses, le procédé suivant a été retenu : les limbes (200 g), préalablement desséchés à l'air libre à une température voisine de 20 °C, sont broyés et lixiviés à froid par l'acétone anhydre (1 l) qui entraîne divers constituants liposolubles et quelques constituants polyphénoliques. Puis la lixiviation est poursuivie avec de l'acétone contenant 5 % d'eau (5 l) qui déplace divers produits dont Fv B. Le solvant organique de l'extrait est éliminé par distillation à une température inférieure à 40 °C.

On ajuste le pH à 6,8-7,0 au moyen d'ammoniaque diluée et on procède à un épuisement par l'acétate d'éthyle (20 ml, 20 fois). L'extrait résiduel, privé par ce traitement de Fv A et d'autres polyphénols, est acidifié par de l'acide chlorhydrique dilué jusqu'à pH 4,4-4,6 ; l'extraction par l'acétate d'éthyle (20 ml, 20 fois) permet alors d'entraîner Fv B hors de la phase aqueuse. Après élimination du solvant (à $T<40$ °C), le résidu repris par 5 ml d'eau est chromatographié sur colonne de cellulose Whatman sèche (hauteur 30 cm, diamètre 1 cm). L'élution est réalisée au moyen d'acide acétique dilué (0,002 N, 125 ml), puis par de l'eau distillée. Les premières fractions contiennent divers polyphénols, Fv B est déplacé ensuite. Après distillation du solvant (à $T<40$ °C), le résidu concentré à 2 ml laisse, après un séjour de 24 h à +4 °C, déposer un précipité cristallin de Fv B (rendement : 20 mg/200 g de feuilles séchées). La recristallisation est faite dans l'alcool à 50 % en volume.

2. Propriétés physiques et chimiques de Fv B

Poudre microcristalline jaune, la substance est soluble dans les solvants polaires et très soluble dans l'eau froide, insoluble dans les solvants non polaires. P.F. instantané : 215 °C - 220 °C. En chromatographie sur papier, les valeurs de *Rf* sont respectivement : 0,68 (S_1), 0,21 (S_2 à 2 %), 0,70 (S_3), 0,62 (S_4).

L'hydrolyse est réalisée sur 5 mg de substance à 95 °C, en 3 h, à l'aide d'acide sulfurique N (5 ml). Après addition de soude N (5 ml), puis d'eau distillée (30 ml), cette solution neutralisée est extraite par l'acétate d'éthyle (5 ml, 15 fois). Les fractions de ce solvant sont lavées avec 1 ml d'eau (2 fois) et l'eau de lavage est ajoutée à la phase aqueuse précédemment épuisée ; on ajuste à 50 ml. Cette solution sert au dosage du glucose. La phase acétate d'éthyle est évaporée dans une capsule ; le résidu est redissous dans 50 ml d'alcool méthylique. Cette solution conduit au dosage du quercétol, qui est réalisé par spectrophotométrie du chélate obtenu avec le chlorure d'aluminium, selon une méthode très souvent utilisée par la suite :

Solution de quercétol	0,50	ml
Alcool éthylique à 95% en volumes	1,50	ml
Solution aqueuse d'acide acétique à 1 %	1	ml
Solution aqueuse de pyridine à 2 %	2	ml
Solution alcoolique de chlorure d'aluminium 0,5 M	1	ml

L'absorption dans le violet est mesurée après 30 mn à 420 et 430 mμ parallèlement aux colorations fournies par une gamme (20, 40, 60 et 80 μg par ml), préparée

à l'aide d'une solution de quercétol étalon dans l'alcool méthylique (20 mg/20 ml) (Appareil Unicam 500 ou Jobin et Yvon « Maroc »). L'étalon est, préalablement à la pesée, desséché sous vide phosphorique à 20 °C, tandis que la teneur en eau est appréciée sur un autre échantillon du même lot, par pesée jusqu'à masse constante après dessiccation à 105 °±2 °C. Le glucose est dosé selon SOMOGYI (1937).

Les valeurs obtenues pour l'hétéroside, dans une expérience d'hydrolyse portant sur 5 mg de Fv B, sont en pourcentage :

quercétol	39,2	et	37,0
glucose	70,0	et	66,0

Elles sont en accord avec les valeurs calculées pour un quercétol-triglucoside, respectivement de 38,3 et 68,5 (chaque liaison osidique, entre l'aglycone et l'ose ou entre deux oses, correspond à l'élimination d'une molécule d'eau). Une expérience pratiquée dans ces mêmes conditions sur l'isoquercitroside fournit 38,5 % de glucose (théorie : 38,8).

Quelle est la nature de ce triglucoside ? Puisque, par hydrolyse dans l'eau à pH 6,0 et plus rapidement à chaud, Fv B libère de l'isoquercitroside, une molécule de glucose au moins est fixée en 3 (fig. 1). D'autre part, l'étude du spectre d'absorption en présence de divers réactifs (SKARZYNSKI, 1939 ; JURD et HOROWITZ, 1957) peut indiquer si les oses en 5, 3′ et 4′ du quercétol sont libres ou occupés par des restes glucosyles. Cette étude est menée comparativement pour Fv B et Fv A. Les résultats sont présentés dans le tableau I. L'hétéroside flavonique est dissous à la concentration de $2 \cdot 10^{-5}$ dans l'alcool éthylique pur ou dans des solutions 0,002 M d'hydroxyde de sodium ou de chlorure d'aluminium dans l'alcool éthylique, ainsi que dans des solutions d'acétate de sodium ou d'acide borique et acétate de sodium (GEISSMAN, 1962) au 1/10 de la saturation. L'acétate de sodium décale respectivement de 23 (pic I) et 12 mμ (pic II) pour Fv A et de 21 et 9 mμ pour Fv B, indiquant un OH en 4′ libre. L'acide borique en présence d'acétate de sodium produit un effet bathochrome du même ordre : 21 (pic I) et 5 mμ (pic II) pour Fv A, 22 et 5 mμ pour Fv B, en accord avec l'existence de deux hydroxyles en ortho (3′ et 4′) libres. Le chlorure d'aluminium fournit un chélate avec dédoublement du pic I et décalage du pic II, signant ainsi l'existence en 5 d'un OH libre. Ainsi deux structures restent possibles : quercétol 3-triglucoside ou quercétol 3-glucoside 7-diglucoside.

TABLEAU I

Position des pics d'absorption en mμ des flavonoïdes Fv A et Fv B en présence de divers réactifs

Solvants	Fv A		Fv B	
	Pic I	Pic II	Pic I	Pic II
Alcool neutre	360	258	360	258
Solutions alcooliques de :				
Hydroxyde de sodium	415	273	415	272
Acétate de sodium	383	270	381	267
Acétate de sodium+acide borique	381	263	382	263
	Pic I_a I_b	Pic II	Pic I_a I_b	Pic II
Chlorure d'aluminium	408 360	270	406 359	274

Je ne puis affirmer que cette substance est nouvelle puisque déjà la présence d'un triglucoside du quercétol avait été supposée par OSHIMA et NAKABAYASHI (1954) chez le Théier, résultat non confirmé par ROBERTS, CARTWRIGHT et WOOD (1956). L'existence d'un tel hétéroside chez *Primula sinensis* fut avancée par HARBORNE et SHERRATT (1961). FURUYA et GALSTON (1965) décrivirent dans les plantules de Pois une série d'hétérosides flavoniques, parmi lesquels un quercétol-3 triglucoside, mais il ne m'a pas été possible d'obtenir d'échantillon de ce produit en vue d'une étude comparative avec Fv B.

3. Flavonoïde C

Présent dans les pièces florales (DELAVEAU, 1965 *a*), à faible concentration, ce flavonoïde a été identifié à un glucoside du kæmpférol (fig. 1).

Discussion

A partir des tiges, pétioles et surtout limbes foliaires récoltés chez des plantes adultes, ont été séparés des polyphénols parmi lesquels deux glucosides du quercétol, Fv A et Fv B et un acide du groupe chlorogénique. Les fleurs contiennent en plus un glucoside du kæmpférol, Fv C. Graines et racines sont dépourvues de ces polyphénols. La péricarpe des fruits paraît riche en « acide chlorogénique » et pauvre en flavonoïdes.

Fv B est un triglucoside de quercétol appartenant à un groupe d'hétérosides encore mal connus. Peut-être n'a-t-il pas encore été décrit. Sa fragilité est extrême. Les diverses opérations habituelles d'extraction l'hydrolysent très vite ; même au cours de la conservation des extraits alcooliques, on observe la disparition progressive de Fv B, tandis qu'apparaissent des quantités croissantes de Fv A. Si l'on traite à froid par l'alcool méthylique des limbes préalablement lyophilisés, l'extrait obtenu ne contient pratiquement que Fv B ; ainsi Fv A apparaît-il comme un artefact. La raison de la fragilité exceptionnelle de Fv B n'a pu être jusqu'à présent expliquée.

Dans la Moutarde blanche, *Sinapis alba* L., doit exister un hétéroside de même type libérant très facilement de l'astragaline ou kæmpférol-3 glucoside (CLAIR, DELAVEAU et PARIS, 1964). Il est permis de penser que ce type de molécules très labiles doit être répandu et que, dans de nombreuses plantes, les hétérosides isolés ne sont que des produits de dédoublement de substances initiales très fragiles. D'autre part, la très grande solubilité de Fv B dans l'eau doit être soulignée, eu égard à son état et son rôle dans la cellule végétale.

Glucosides du quercétol et « acide chlorogénique » présentent un même groupement o-dihydroxy-phénol retrouvé également dans le cyanidol, anthocyane des fleurs de Capucine. Celles-ci contiennent aussi des dérivés de la pélargonidine dont le groupement monohydroxy-phénol est encore celui du kaempférol (Fv C). Ces rapprochements suggèrent des voies de biogenèse voisines.

B. RÉPARTITION ET VARIATIONS DES FLAVONOIDES AU COURS DU DÉVELOPPEMENT

1. Méthodes de dosage

Parmi les méthodes de dosage proposées (DELAVEAU, 1966), il en est peu d'applicables à des expériences de physiologie végétale. Nous avons retenu, avec des modifications personnelles : 1) la spectrophotométrie du chélate flavonoïdes-aluminium à 410 mμ, selon la technique de RÖMISCH légèrement modifiée ; 2) la densitométrie des taches de chromatographie.

La marche du dosage comprend un temps d'extraction, un temps de purification de l'extrait, le dosage proprement dit, dont la description et la discussion sont publiées ailleurs (DELAVEAU, 1967). L'erreur de la méthode de dosage spectrophotométrique, régulièrement utilisée, est de $\pm 14{,}6$ ou $\pm 12{,}2$ % selon le mode opératoire (avec $P = 0{,}05$). Il a été vérifié qu'en présence des réactifs du dosage, Fv A et Fv B possèdent un même coefficient d'extinction, si bien que le dosage peut porter sans difficulté sur des extraits contenant ces deux hétérosides en proportions variables.

2. Répartition des flavonoïdes dans les divers organes au début de la floraison

Chez le Sarrasin, MASCRÉ et PARIS (1950), NÖLL (1955), puis BASSLER (1957) observèrent une répartition inégale des flavonoïdes, plus abondants dans les feuilles jeunes. Des observations du même ordre ont été faites par TRONCHET (1959, 1965).

Une première investigation est menée chez des plantes au début de la floraison lorsque la tige atteint 30 à 40 cm de long. On partage les feuilles en quatre groupes de 4 à 8 selon leur niveau d'insertion sur la tige. Les pétioles du bas sont les plus longs (40 à 45 cm) et les plus grêles. Les pétioles moyens mesurent de 35 à 40 cm, les supérieurs 30 à 35 cm. De la sorte, la plupart des limbes se placent à des niveaux assez voisins. Le diamètre des limbes varie de 7 à 9 cm pour les feuilles inférieures, de 8 à 11 pour les feuilles moyennes, de 8 à 10 pour les supérieures ; les très jeunes limbes ne dépassent pas 2 cm.

Ni par chromatographie, ni par spectrophotométrie, il n'est possible de caractériser de flavonoïdes dans les racines. Au contraire, tous les organes aériens en contiennent des quantités fort différentes. D'autre part, une variation de teneur est observée dans les pétioles, la partie inférieure accusant des valeurs voisines de celle des tiges, tandis que la partie supérieure est quinze fois plus riche (DELAVEAU, 1965 *a*). De même les flavonoïdes sont inégalement répartis dans les limbes : la région centrale accuse 206 mg ($\sigma = 18{,}0$) et la région périphérique 276 mg ($\sigma = 19{,}6$) en isoquercitroside pour 100 g de matière fraîche.

Mais il n'a pas pu être observé de différence de teneur entre les limbes de feuilles adultes insérées à des hauteurs variables sur la tige — feuilles dont les limbes présentent d'ailleurs un même aspect — sauf en ce qui concerne les très jeunes feuilles. Bien que pondéralement peu importantes, puisque celles-ci comptent seulement pour 0,5 % de la masse fraîche totale des organes aériens et 2,8 % de la masse totale des limbes, elles sont très riches en flavonoïdes et arrivent donc à contenir environ 4 % des flavonoïdes de l'ensemble des limbes. Les limbes contiennent de 83 à 87 % des flavonoïdes répartis dans l'ensemble de la tige et des feuilles.

Dans les fleurs, la quantité de flavonoïdes, parmi lesquels Fv C est surtout localisé aux pétales (DELAVEAU, 1965 *a*), est faible (0,9 mg environ par fleur). Au cours de la pleine floraison, cette quantité peut atteindre 9 à 15 mg, tandis que l'ensemble des feuilles et des tiges peut contenir de 50 à 150 mg de ces pigments par plante. Les fruits verts ne renferment que très peu de Fv B (20 mg pour 100 g. de fruits frais), localisé uniquement dans le péricarpe.

3. Variations au cours du développement de l'appareil végétatif aérien

Les plantes sont récoltées 5 et 9 jours après la germination (phase I), puis 30 jours (phase II), et 70 jours (phase III) au début de la floraison, selon les observations morphologiques faites antérieurement (DELAVEAU, 1965 *b*). Les résultats des dosages sont présentés dans les tableaux II, III, IV et V. Ils groupent moyennes et écarts-types correspondant dans chaque cas à des essais parallèles répétés de 5 à 10 fois.

Absents de la graine, les flavonoïdes atteignent très vite, chez la jeune plantule, une teneur élevée, supérieure à toutes les valeurs observées ultérieurement. Rapportée à la matière fraîche ou à la matière sèche, cette teneur décroît ensuite assez vite pour rester à peu près constante au cours des phases III et IV chez la plantule adulte.

Au cours d'une autre expérience, où le dosage porte sur les flavonoïdes de l'ensemble des limbes, on voit que la variation de teneur en flavonoïdes, rapportée à la matière fraîche ou sèche (fig. 2), est accentuée au cours des phases I et II. Mais l'accroissement de la masse des limbes est tellement intense au cours de la phase III qu'il masque la diminution relative de la teneur en flavonoïdes de telle sorte que la variation de la quantité des flavonoïdes de l'ensemble des limbes d'une plante suit une courbe en *S* (fig. 3), voisine de celle de la variation de masse des limbes. Autre-

TABLEAU II

Répartition des flavonoïdes dans la tige et les feuilles de plantes de 5 jours.

Teneur exprimée en milligrammes d'isoquercitroside pour 100 g de matière fraîche (TMF) ou sèche (TMS). Quantité en microgrammes par plante (QP). Pourcentage des flavonoïdes totaux d'une plante. Moyennes et écarts-types entre parenthèses.

Organe	Masse par plante	Matière sèche p. 100 g d'organe	Flavonoïdes			
			TMF	TMS	QP	%
	mg	g	mg	mg	µg	
Racines	39	7,5	0	0	0	0
Tige	46	8,2	51 (5)	620 (61)	23 (2,5)	2,1
Pétioles	43	8,4	86 (9)	102 (10,8)	37 (4,2)	3,5
Limbes	105	17,5	673 (78)	3840 (44,5)	1010 (98)	94,4
Total	472				1070	100

ment dit la biogenèse des flavonoïdes est extrêmement active au tout début de la vie de la plante, pendant la période d'utilisation des réserves cotylédonaires (DELAVEAU,

TABLEAU III

Répartition des flavonoïdes dans la tige et les feuilles de plantes de 9 jours.

Teneur exprimée en milligrammes d'isoquercitroside pour 100 g de matière fraîche (TMF) ou sèche (TMS). Quantité en microgrammes par plante (QP). Pourcentage des flavonoïdes totaux d'une plante. Moyennes et écarts-types entre parenthèses.

Organe	Masse par plante mg	Matière sèche p. 100 g d'organe g	Flavonoïdes			
			TMF mg	TMS mg	QP µg	%
Racines	85	8,0	0	0	0	0
Tiges	76 (7,4)	9,0	96 (8,8)	1070 (99)	73 (8)	5,4
Pétioles	112 (10,2)	9,2	113 (25)	1230 (272)	127 (15)	9,4
Limbes	252 (28)	17,0	457 (42)	2700 (249)	1150 (130)	85,2
Total	525				1350	100

TABLEAU IV

Répartition des flavonoïdes dans les tiges et les feuilles de plantes de 30 jours

Teneur exprimée en milligrammes d'isoquercitroside pour 100 g de matière fraîche (TMF) ou sèche (TMS). Quantité en milligrammes par plante (QP). Pourcentage des flavonoïdes totaux d'une plante. Moyennes et écarts-types entre parenthèses.

Organe	Masse par plante mg	Matière sèche p. 100 g d'organe g	Flavonoïdes			
			TMF mg	TMS mg	QP mg	%
Racines	5,1	8,0	0	0	0	0
Tige	2,8 (0,4)	9,5	13,6 (1,5)	144 (16)	0,38 (0,05)	2,3
Pétioles inférieurs	3,9 (0,4)	9,6	21 (2,3)	228 (25)	0,82 (0,09)	
Pétioles supérieurs	5,7 (0,6)	9,9	25 (2,6)	253 (26)	1,42 (0,17)	13,8
Limbes inférieurs ...	2,9 (0,22)	16,7	214 (20)	1280 (156)	6,20 (0,7)	
Limbes ..... supérieurs	2,9) (0,23)	16,5	255 (26)	1548 (158)	7,40 (0,8)	84,9
Limbes très jeunes	0,1 (0,01)	18,2	281 (39)	1550 (210)	0,03 (0,01)	
Total	23,4				16,25	

TABLEAU V

Répartition des flavonoïdes dans la tige, les feuilles et les fleurs de plantes de 70 jours.

Teneur exprimée en milligrammes d'isoquercitroside pour 100 g de matière fraîche (TMF) ou sèche (TMS). Quantité en milligrammes par plante (QP). Pourcentage des flavonoïdes totaux d'une plante. Moyennes et écarts-types entre parenthèses.

Organe	Masse par plante mg	Matière sèche p. 100 g d'organe g	Flavonoïdes TMF mg	Flavonoïdes TMS mg	Flavonoïdes QP mg	%
Racines	6,9	7,0	0	0	0	0
Tige	7,5 (0,9)	7,2	4 (0,4)	56 (6,0)	0,3 (0,08)	0,9
Pétioles ..... inférieurs	8,2 (0,8)	7,8	22 (2,5)	282 (3,2)	1,7 (0,2)	
Pétioles ..... supérieurs	11 (1,8)	8,1	14 (1,8)	173 (22,2)	1,5 (0,6)	9,6
Pétioles très jeunes	0,1	8,0	—	—	—	
Limbes ..... inférieurs	4,8 (0,5)	16,9	268 (28)	1580 (165)	12,8 (15)	
Limbes ..... supérieurs	5,7 (0,6)	17,5	261 (27)	1490 (154)	14,9 (1,7)	85,3
Limbes très jeunes	0,2 (0,08)	18,3	310 (37)	1695 (204)	0,6 (0,09)	
Fleurs et pédoncules.....	1,8 (0,9)	10,1	80 (9)	793 (89)	1,4 (0,6)	4,2
Total	46,1				33,2	100

1965 *b*) ; puis tout en diminuant d'intensité, elle se maintient pendant toute la croissance de la plante avec la formation de nouvelles feuilles. Ainsi apparaît un rapport étroit entre teneur en flavonoïdes et masse des limbes.

Discussion

La répartition des flavonoïdes dans les divers organes de la Capucine est donc inégale. Toujours absents de la racine, ils sont retrouvés dans les divers organes aériens ; mais ce sont les limbes foliaires qui accusent toujours la teneur, rapportée à l'unité de masse fraîche ou sèche, la plus élevée.

L'ensemble des limbes d'une plante contient de 83 à 95 % du total des flavonoïdes de cette plante. La quantité de flavonoïdes rapportée à une plante s'accroît en même temps que la masse de celle-ci. Mais la teneur, rapportée à l'unité de masse fraîche ou sèche, des organes jeunes est plus élevée que celle des mêmes organes adultes.

Déjà SPRECHER (1956) observait une teneur en flavonoïdes plus élevée chez la plantule de Rue que chez la plante adulte et confirmait la diminution de teneur au moment de la floraison, signalée par MASCRÉ et PARIS (1936). Les modifications survenant alors ont peut-être un caractère général (NÖLL, 1959, CLAIR et alii, 1964).

Mais dans le cas de la Capucine, cette « crise de la floraison « (DELAVEAU et PARIS, 1961) n'est pas très nette : la teneur en flavonoïdes des limbes, rapportée à l'unité de masse sèche, reste à peu près constante jusqu'à la floraison.

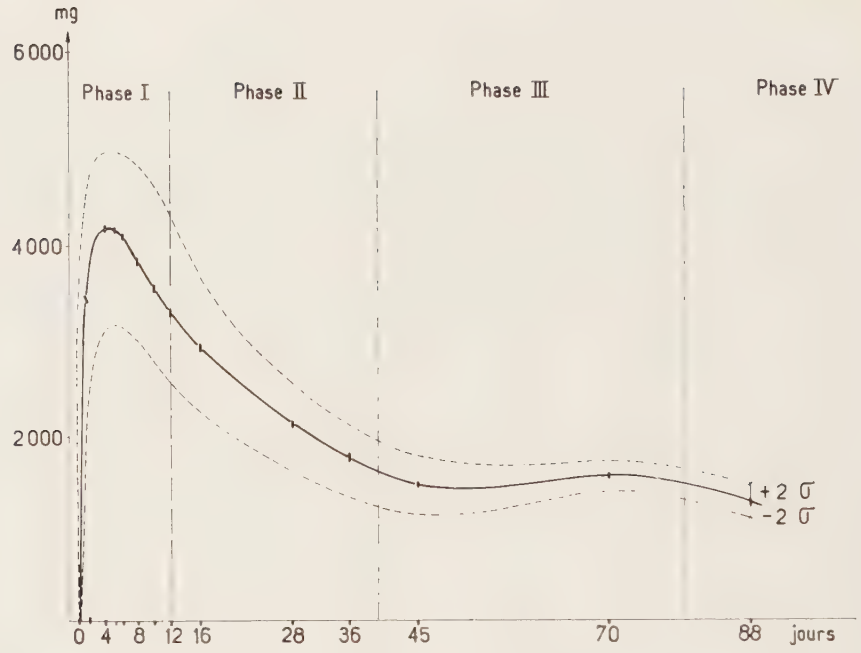


FIG. 2. — Variation de la teneur en flavonoïdes au cours du développement, exprimée en milligrammes d'isoquercitroside pour 100 g de matière sèche de l'ensemble des limbes d'une plante.

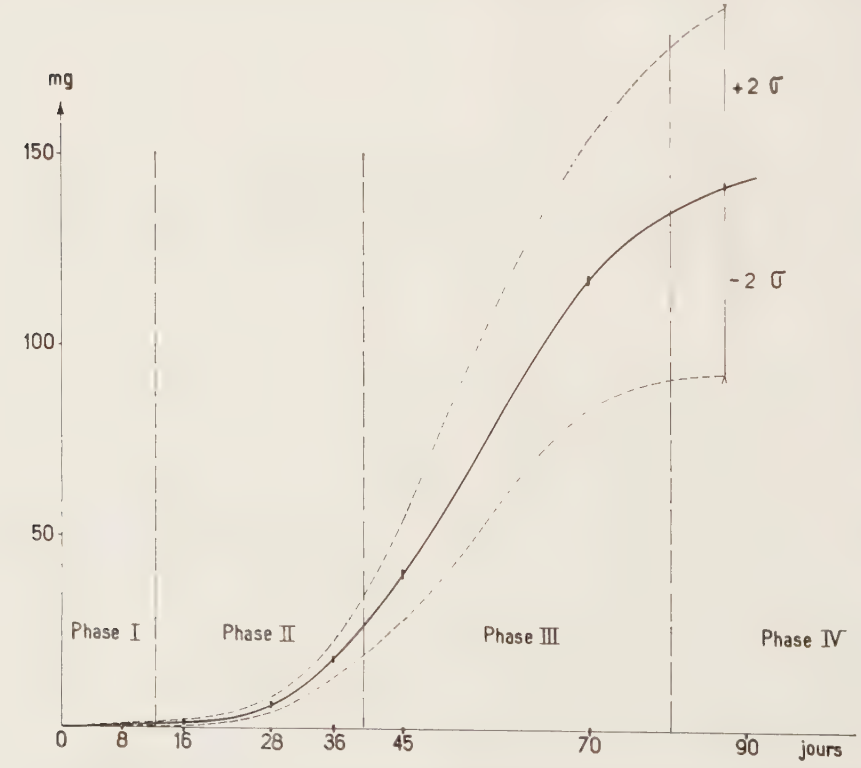


FIG. 3. — Variation de la teneur en flavonoïdes de l'ensemble des limbes d'une plante au cours du développement.

C. VARIATION DES FLAVONOIDES EN FONCTION DES CONDITIONS DE CULTURE, EN PARTICULIER DE L'ÉCLAIREMENT

Les feuilles étiolées isolées de *Polygonum bistorta L.*, mises en présence de saccharose, ne synthétisent les flavonoïdes qu'à la lumière (NICK, 1953). La teneur en flavonoïdes des feuilles de *Fagopyrum sagittatum* Gilib. et *F. tataricum* (L) Gärtner est plus élevée chez les plantes cultivées en plein soleil que chez les plantes mises à l'ombre; en serre, à température sensiblement constante également, la lumière ne serait pas un facteur obligatoire pour l'apparition de flavonoïdes, mais agirait quantitativement en intensité et durée (BASSLER, 1957).

Pour étudier l'influence éventuelle de la lumière sur la teneur en flavonoïdes de la Capucine, une série d'expériences a été menée en chambre climatisée ou « microphytotron Crapez » (1). Au début de ce travail, nous recherchions la relation pouvant exister entre l'intensité de l'éclairement et la teneur en flavonoïdes par répercussion des processus photosynthétiques. En effectuant ces expériences sur des plantules de plus en plus jeunes est apparue ensuite une autre notion, celle d'un seuil lumineux nécessaire pour déclencher la formation des flavonoïdes. Chaque fois, le dosage des flavonoïdes, effectué par mesure de l'absorption du chélate d'aluminium — selon le procédé décrit à propos du dosage du quercétol dans le triglucoside Fv B — n'a porté que sur les limbes foliaires. Les teneurs appréciées pour les pétioles et les tiges des plantes cultivées à un faible éclairement restent si faibles que les variations attendues sont effacées par les erreurs expérimentales. D'autre part, tous les limbes d'une même plante sont réunis, bien que les très jeunes limbes aient une teneur généralement plus élevée que les limbes plus développés. Ce mode opératoire est justifié par la masse fort réduite de ces très jeunes limbes. Enfin dans la plupart des expériences, pour un même essai, les limbes de plusieurs plantes doivent être réunis en raison de leur faible masse.

1. Eclairement continu

Le régime du « microphytotron » est défini par les caractéristiques suivantes : température $T = 23^{\circ} \pm 1\ ^{\circ}C$, degré hygrométrique compris entre 60 et 70 % ; éclairement continu assuré à deux éclairements différents : $E = 3\,600$ et $e = 2\,400$ lx. Les graines sont semées sur compost habituel (terre et terreau à masses égales). Les plantes sont récoltées après 6, 10, 15 et 20 jours. Les résultats des dosages sont rapportés dans le tableau VI, où figurent également les valeurs obtenues pour les plantes témoins cultivées en pleine terre.

Ces deux éclairements E et e sont très faibles par rapport à l'éclairement solaire. Les plantes peu éclairées, E et e, ont une croissance d'abord identique à celle des plantes cultivées en conditions normales, mais dès le 10e jour elles se différencient assez nettement des secondes : les tiges et les pétioles s'allongent, les limbes ont une surface plus grande et une épaisseur plus faible ; ceci se traduit par une masse totale

(1) Serre de 1,4×1 m sur 1,2 m de hauteur avec dispositifs de réglage de la température, de l'humidité et de l'éclairement (tubes fluorescents Mazda « Blanc super »).

TABLEAU VI

Répartition des flavonoïdes chez des plantes de 6 à 20 jours faiblement éclairées de façon continue.

Culture en pleine terre et en « microphytotron » (Mi). Teneur de l'ensemble des limbes d'une plante exprimée en milligrammes d'isoquercitroside pour 100 g de matière fraîche (TMF) ou sèche (TMS). Quantité en microgrammes par plante (QP). Moyennes et écarts-types entre parenthèses.

Age des plantes Jours	Eclairement Lx	Nombre d'essais	Masse des limbes par plante mg	Matière sèche p. 100 g d'organe g	Flavonoïdes		
					TMF mg	TMS mg	QP µg
6	Pleine terre	5	148 (10)	18,0	520 (83)	2890 (461)	770 (160)
	Mi 3 600	9	150 (11)	13,5	156 (25)	1155 (185)	283 (56)
	Mi 2 400	10	160 (11)	13,5	149 (26)	1101 (193)	240 (39)
10	Pleine terre	8	250 (21)	17,8	475 (70)	2670 (314)	1190 (129)
	Mi 3 600	13	293 (24)	11,7	77,4 (9,2)	661 (78)	225 (29)
	Mi 2 400	10	260 (22)	11,5	76 (11)	661 (95)	190 (18)
15	Pleine terre	7	735 (93)	16,8	478 (59)	2836 (355)	3500 (450)
	Mi 3 600	5	340 (33)	11,5	46,6 (2,7)	492 (23)	156 (16)
	Mi 2 400	6	280 (66)	11,3	56 (9,5)	584 (84)	160 (27)
20	Pleine terre	6	1510	16,8	406 (40)	2420 (238)	6130 (950)
	Mi 3 600	6	400 (41)	11,5	45,6 (4,5)	397 (39)	182 (24)

des limbes assez réduite et ne progressant guère au cours de la culture. La teneur en matière sèche est d'autre part plus réduite que chez les plantes témoins. Enfin, la différence d'éclairement entre *E* et *e* n'entraîne pratiquement pas de variation entre les teneurs en flavonoïdes rapportées à 100 g de matière fraîche ou sèche. Celles-ci sont bien inférieures à celles des plantes témoins, mais on note, comme pour celles-ci, des valeurs plus élevées chez les jeunes plantes. Tout se passe comme si la plantule était capable, au cours des tous premiers jours, de synthétiser intensément les flavonoïdes malgré un éclairement assez faible, puis comme si celui-ci n'était plus suffisant dans la période suivante pour assurer une active biosynthèse des flavonoïdes.

Puisque la quantité par individu décroît ensuite, faut-il supposer que les flavonoïdes biosynthétisés ne s'accumulent pas, mais plutôt subissent un catabolisme ? Cependant il faut observer que cette diminution de quantité n'est pas constante. Déjà BASSLER (1957) supposait pour les flavonoïdes du Sarrasin un double mouvement d'anabolisme et de catabolisme. Ce dernier l'emporterait lorsque l'éclairement des plantules est faible, comme dans les conditions de notre expérience.

2. Eclairements discontinus

a) Jours de 16 h avec $T = 23^{o} \pm 1$ °C, degré hygrométrique : 60-70 % ; nuits de 8 h avec $T = 18^{o} \pm 1$ °C, degré hygrométrique : 70-80 %. Trois éclairements : $E = 16\,000$ lx, $e = 6\,000$ lx, $\varepsilon = 4\,200$ lx.

Au 5e jour, la masse fraîche des limbes des plantes *E* est supérieure à celle des limbes des plantes *e* et ε (tableau VII) ; au 12e jour, cette différence s'atténue. La teneur en matière sèche des plantes *E* est voisine de celle des témoins cultivés en pleine terre. Les teneurs en flanovoïdes pour 100 g de limbes (matière fraîche ou sèche) sont plus élevées au 5e jour qu'au 12e, comme lors des expériences précédentes. Pour les plantes des trois séries, la teneur rapportée à la matière fraîche est assez voisine au 5e jour pour les trois séries de plantes. L'influence de l'éclairement apparaît modérément si l'on rapporte à la matière fraîche, mais ne le fait pas si c'est à la matière sèche. La différence des teneurs pour 100 g des trois séries de plantes est plus nette au 12e jour. D'autre part, la quantité rapportée à une plante est fonction de l'intensité lumineuse qui joue également sur l'augmentation de la masse des plantes.

Il se confirme donc que, chez de jeunes plantes ayant de 5 à 7 feuilles, la teneur en flavonoïdes est fonction de l'éclairement. Au contraire, au début de la croissance, à une grande différence d'éclairement (16 000 et 4 200 lx) ne correspond qu'une faible variation de teneur pour 100 g.

Tableau VII

Répartition des flavonoïdes chez des plantes de 5 à 12 jours éclairées en jours longs de 16 heures.

Culture en pleine terre ou en « microphytotron » (Mi). Teneur de l'ensemble des limbes d'une plante exprimée en milligrammes d'isoquercitroside pour 100 g de matière fraîche (TMF) ou sèche (TMS). Quantité en milligrammes par plante (QP). Moyennes accompagnées des écarts-types entre parenthèses.

Age des plantes	Eclairement Lx	Nombre d'essais	Masse des limbes par plante mg	Matière sèche p. 100 d'organe g	Flavonoïdes		
					TMF mg	TMS mg	QP µg
5 jours	Pleine terre	5	100	18,1	720 (112)	3980 (620)	720 (117)
	Mi 16 000	9	134	15,1	269 (18,8)	1780 (124)	405 (25)
	Mi 6 000	9	126	12,2	230 (27,8)	1820 (219)	302 (48)
	Mi 4 200	9	151	12,0	221 (24,4)	1840 (218)	294 (22)
12 jours	Pleine terre	10	420	16,8	570 (70,5)	3400 (430)	2400 (310)
	Mi 16 000	10	510	19,0	159 (22,2)	836 (117)	805 (72)
	Mi 6 000	10	488	12,8	99,5 (13,9)	779 (109)	555 (56)
	Mi 4 200	10	510	10,9	67,8 (9,4)	622 (87)	346 (36)

b) Jours de 16 h avec $T = 22^{o} \pm 1$ °C, degré hygrométrique : 60-70 % ; nuits de 8 h avec $T = 16^{o} \pm 1$ °C, degré hygrométrique : 70-80 % ; éclairements : 16 000, 5 100, 1 600, 720, 340 et 160 lx. Des témoins sont laissés à l'obscurité. La levée de chaque graine est notée de façon à permettre une appréciation exacte de l'âge de la plantule : 9, 24, 72, 108 h et 13 j. En raison de la très faible masse des limbes et de la multiplication des prélèvements, les essais ne sont pas répétés, aussi les résultats sont-ils approximatifs (tableau VIII). Pourtant deux faits apparaissent :

1) aux cinq plus faibles éclairements, la teneur en flavonoïdes pour 100 g de limbes frais atteint un maximum au 3e jour, puis décroît ;

2) la différence entre les valeurs obtenues est faible malgré la variation considérable des éclairements.

TABLEAU VIII

Teneur en flavonoïdes de plantules de 9 heures à 13 jours faiblement éclairées en jours longs

Culture en pleine terre ou en « microphytotron » (Mi). Teneur exprimée en milligrammes d'isoquercitroside pour 100 g de matière fraîche (TMF) et quantité en microgrammes par plante (QP).

Age des plantes	Pleine terre		« Microphytotron »											
			16 000 lx		5 100 lx		1 600 lx		720 lx		340 lx		160 lx	
	TMF mg	QP µg	TMF mg	QP µg	TMF mg	QP µg	TMF mg	QP µg	TMF mg	QP µg	TMF mg	QP µg	TMF mg	QP µg
9 heures	200	45			51	11	107	3,3	135	6,6	106	7,3		
24 heures	500	150			306	49	165	18,5	166	20,5	128	12,5	190	15
					293	42			158	15,5			182	16,5
72 heures.....	750	390			236	235	234	102	192	91	245	67,5	316	77
					284	248	204	100	225	85	244	72	250	65
					305	254								
					302	286								
108 heures	750	675	111	175			119	96,5	112	51	105	51	154	84
			135	220			114	104						
13 jours	570	2400	196	960	82	420	57	108	94	203	63	44	88	65
			160	700	121	650	71	126	79	115				
			149	800	122	650								
			145	750	108	410								
			165	715	132	440								
			155	840	115	390								
			150	780	107	360								
					126	460								

Au 13e jour, seuls les deux éclairements les plus élevés conduisent à une teneur importante en flavonoïdes.

Ainsi, chez la plantule, au moment où se déroule la crosse épicotylée, la bioge-

nèse des flavonoïdes peut-elle être déjà déclenchée par un stimulus lumineux très faible (dès 160 lx). Elle se poursuit avec intensité (maximum de teneur vers le 13e jour), puis se ralentit, si l'éclairement est faible. Au contraire, chez les plantes plus éclairées,cette biogenèse reste très active pendant une période plus prolongée (15 jours au moins). Peut-être les précurseurs nécessaires à la biogenèse des flavonoïdes sont-ils alors fournis en quantité suffisante par une photosynthèse plus active. Au contraire, chez la plantule, la biogenèse des flavonoïdes se réalise-t-elle indépendamment de la photosynthèse, à partir de précurseurs accumulés dans la graine et disponibles dès la germination ? On examine ce point plus loin.

c) En restant dans des conditions normales d'humidité, il peut être intéressant d'examiner l'effet de brefs éclairements sur de très jeunes plantules étiolées. La culture est réalisée sur compost habituel, avec les conditions suivantes : $T = 18^{o} \pm 2$ °C, degré hygrométrique : 50 % ; obscurité complète. Pour éviter tout risque d'éclairement qui troublerait la marche de l'expérience, l'âge des plantules — nombre de jours après la levée ces graines — est apprécié à l'aide de cultures menées parallèlement dans des conditions identiques et examinées jour après jour. Après un maintien à l'obscurité variant de 2 à 6 jours après germination, les plantules sont éclairées par la lumière artificielle blanche de tubes fluorescents (environ 1 000 lx) pendant une brève période de 1 ou 5 mn selon les cas, puis replacées à l'obscurité pendant deux ou quatre jours. Les plantules sont alors dénombrées, les feuilles sont excisées au niveau du nœud, pesées et fixées à l'alcool bouillant. Des plantules, conservées constamment à l'obscurité, servent de « Témoins-obscurité ». Ces dernières plantules sont grêles et atteignent 15 cm de haut, avec des limbes foliaires jaune très pâle, réduits à 1 mm de diamètre. Les plantules éclairées sont un peu plus courtes (12 cm cm en moyenne) ; leurs limbes, d'un jaune plus soutenu, sont un peu plus développés (2 à 3 mm de diamètre). Les extraits des limbes des plantes éclairées fournissent dans les conditions du dosage spectrophotométrique une coloration jaune assez pâle, dont la courbe d'absorption est caractéristique du chélate flavonoïde-aluminium. La mesure est faite à 410 mμ.

Les teneurs en flavonoïdes rapportées à 100 g de masse fraîche de limbes (tableau IX) sont très faibles eu égard à celles que présentent des plantules de 6 jours cultivées à 16 000 lx en jours de 16 h et qui servent de « Témoins-lumière ». Les valeurs les plus élevées sont obtenues dans les essais 7, 8, 9 et 10. D'autre part les « Témoins-obscurité » accusent une teneur en flavonoïdes pratiquement nulle.

J'ai recherché en vain l'existence d'un seuil d'éclairement : en réduisant la durée de celui-ci à 30, 15 et 6 s, j'ai obtenu les valeurs respectives de 22, 15 et 2 mg de flavonoïdes pour 100 g de limbes frais.

D'autre part, pour examiner si une élévation de la température est susceptible de provoquer une crise de la formation des flavonoïdes, des plantules étiolées sont laissées pendant 7 jours à l'obscurité à la température $T = 31^{o} \pm 1$ °C et au degré hygrométrique # 90 %. La teneur en flavonoïdes des limbes foliaires est pratiquement nulle.

Enfin des feuilles excisées de plantules étiolées, sont placées dans des solutions aqueuses à 5 % de glucose et de saccharose pendant trois jours à l'obscurité ($T = 18^{o} \pm 1$ °C, degré hygrométrique # 50 %). Aucun flavonoïde ne peut être caractérisé dans les limbes, au contraire des expériences d'Ahlgrimm (1956) chez le Sarrasin. Pour cet auteur et pour Grisebach et Bopp (1959), la lumière n'est pas un facteur indispensable à la biogenèse des flavonoïdes chez le Sarrasin. Elle l'est au contraire pour celle de jeunes plantes de *Sorghum vulgare* Pers. (Stafford, 1965).

TABLEAU IX

Teneur en flavonoïdes de plantules étiolées subissant de brefs éclairements en lumière blanche

Teneur exprimée en milligrammes d'isoquercitroside pour 100 g de matière fraîche.
TL = « Témoins lumière » : plantes cultivées en pleine terre, âgées de 5 jours.
TO = « Témoins obscurité » : plantes cultivées continuellement à l'obscurité complète jusqu'au moment de la fixation.

N°	Nombre d'essais	Durée du séjour obscur initial	Durée de l'éclairement	Durée du séjour obscur ultérieur	Teneur en flavonoïdes
TL	2	0	80	0	600 et 500 mg
TO	2	2 jours	0	4 jours	<5
1	2	2 jours	1 minute	2 jours	48 et 34
2	2	2	5	2	35 et 38
3	2	2	1	4	47 et 40
4	2	2	5	4	43 et 47
5	1	4	1	2	56
6	1	4	5	2	71
7	1	4	1	4	66
8	1	4	5	4	63
9	1	6	1	2	21
10	1	6	5	2	25
11	1	6	1	4	27
12	1	6	5	4	24

Discussion et conclusion

Plante de lumière, la Grande Capucine exige, pour sa croissance normale et son complet développement, un éclairement suffisant correspondant aux conditions naturelles du climat que connaît la France de mai à août. En même temps apparaît une relation entre l'intensité de l'éclairement et la teneur en flavonoïdes des limbes. Quelles que soient les conditions de culture, en pleine terre ou en « microphytotron Crapez », avec une atmosphère moyennement ou très humide et à des éclairements variables, la teneur en flavonoïdes rapportée à l'unité de masse, fraîche ou sèche, est plus élevée au cours de la phase I et s'abaisse ensuite.

Chez les plantes assez évoluées, à une grande différence d'éclairements correspond une variation marquée des teneurs en flavonoïdes. Il est probable que les plantes recevant un éclairement convenable ont une photosynthèse active qui assure la formation abondante des précurseurs des flavonoïdes. Au contraire chez les jeunes plantules, à une grande différence d'éclairements ne correspond qu'une faible variation des teneurs en flavonoïdes rapportées à l'unité de masse de limbes. Peut-être la biogenèse des flavonoïdes utilise-t-elle alors des précurseurs accumulés dans les cotylédons. L'éclairement pendant des durées de 1 à 5 mn permet de dissocier la biogenèse des flavonoïdes de la photosynthèse : avant même que s'installe celle-ci, des flavonoïdes apparaissent, en quantité faible il est vrai.

Ces expériences menées en lumière blanche produite par des tubes fluorescents conduisent à penser qu'un stimulus même très faible est capable de déclencher la biogenèse des flavonoïdes. Cette observation permet de postuler l'intervention d'un système enzymatique sensible à une faible quantité de lumière et, dans l'état actuel des connaissances, celui du phytochrome peut être invoqué.

D. BIOGENÈSE ET ROLE ÉVENTUEL DES FLAVONOIDES

I. INTERVENTION DU SYSTÈME DU PHYTOCHROME

On sait que le phytochrome, de nature chromoprotéique (Siegelman et Butler, 1965), est impliqué dans de nombreux phénomènes morphologiques. Sous sa forme inactive absorbant dans le rouge clair à 660 mμ, le phytochrome peut être transformé par exposition à cette lumière rouge en une autre forme active, absorbant dans le rouge sombre à 730 mμ ; cette transformation ne requiert qu'une faible énergie (Butler, Hendricks et Siegelman, 1965). La réaction peut être réversible.

Les travaux de Mohr (1962) ont conduit à penser que le système du phytochrome n'est pas le seul à intervenir et Mohr groupe sous le nom « photomorphogenèse » une série de phénomènes, indépendants de la photosynthèse, où la lumière est à l'origine de réactions morphologiques et biochimiques. Par l'expression de « réaction de haute énergie », Mohr entend l'influence d'un éclairement monochromatique maintenu pendant une période longue (24 à 48 h) et dispersant plus d'un joule. Les radiations actives se rangent dans le bleu et le rouge sombre. La réaction n'est pas nécessairement réversible. Un effort de synthèse est actuellement fait pour relier au système du phytochrome la « réaction photomorphogénétique de haute énergie » (Hartmann, 1966 ; Heath et Vince, 1966).

D'autre part Heath et Vince (1962), puis Sale et Vince (1963), ont observé les effets morphogénétiques de la lumière de différentes longueurs d'onde utilisée en réaction dite de « haute énergie » chez la Capucine (variété « Double orange gleam », proche de celle que nous utilisons). Chez le Sarrasin, deux systèmes photoréactifs rattachés, au phytochrome d'une part et à la réaction de haute énergie d'autre part, agissent en synergie : pour la croissance des plantules comme pour la biogenèse des flavonoïdes, les radiations bleue et rouge sont les plus efficaces en « haute énergie » (Harraschain et Mohr, 1963). Le maximum d'activité dans la zone rouge n'est pas défini avec beaucoup de précision (vers 718 mμ).

Hillman et Galston (1957) montrent que l'activité de l'acide indolyl-acétique oxydase des gemmules de jeunes plants étiolés de Pois, variété Alaska, est empêchée par la lumière rouge clair à 640 mμ, qui provoque la formation d'un inhibiteur ; un effet de réversion est observé. Dans la partie dialysable de l'inhibiteur, Mumford, Smith et Castle (1961) caractérisent un flavonol, le kaempférol, sous forme de p-hydroxycinnamoyltriglucoside. Selon leur hypothèse, la lumière rouge clair conduirait donc à une régulation de la croissance par l'intermédiaire d'une combinaison flavonique.

Ces recherches sont reprises par Furuya et Galston (1961), Furuya, Galston et Stowe (1962), puis Furuya et Galston (1965). Ces auteurs parviennent à identifier quatre flavonoïdes que l'on peut grouper deux par deux : un triglucoside et un p-coumaroyltriglucoside de kaempférol et les combinaisons correspondantes de quercétol.

La lumière rouge clair stimule la croissance de la gemmule du Pois et la biogenèse d'un de ces composés, non le p-coumaroyglucoside de kaempférol comme le pensaient Furuya et Thomas (1964), mais celle du p-coumaroylglucoside de quercétol (Bottomley, Smith et Galston, 1966). D'après ces derniers auteurs, le système du phytochrome commanderait la biosynthèse de ce dérivé flavonique, en provoquant notamment une hydroxylation en 3′ (fig. 1).

Pour vérifier si la biosynthèse des flavonoïdes de la Capucine est déclenchée par le système du phytochrome, des expériences ont été menées au Laboratoire du Phytotron de Gif-sur-Yvette. Les plantules étiolées sont éclairées pendant une courte durée à l'aide de radiations monochromatiques produites par l'illuminateur spectral de JACQUES, CHABBAL, CHOUARD et JACQUINOT (1964).

Les graines sont semées sur vermiculite et laine de verre dans des godets dont la surface supérieure (10 × 10 cm) correspond à chacune des plages éclairées par l'illuminateur (50 à 60 graines par godet) et l'apport d'eau est fait sous forme de solution nutritive qui monte par capillarité (Formule : en mg/l : KNO_3 : 274 ; KH_2PO_4 : 137 ; $MgSO_4$, 7 H_2O : 274 ; $(NH_4)_2SO_4$: 137 ; $Ca(NO_3)_2$, $4H_2O$: 1 095 ; EDTA 2Na, Fe : 41 ; KCl : 2,74 ; H_3BO_3 : 3 ; $MnSO_4$, H_2O : 1,7 ; $ZnSO_4$, $7H_2O$: 0,274 ; $(HN_4)_6Mo_6O_{24}$, $4H_2O$: 0,274 ; $CuSO_4$, $5H_2O$: 0,137 ; et H_2SO_4 (d = 1,83) : 0,137 ml/1 000 l).

Les semis (T = 20 °C ± 1 °C) restent à l'obscurité absolue pendant toute la durée de l'expérience, sauf au cours de la très brève période d'éclairement. Les longeurs d'onde retenues sont (en mμ) : violet bleu : 422, vert : 555, jaune : 578, rouge clair : 665, rouge sombre : 745. Après dénombrement, les limbes détachés sont pesés, puis fixés par l'alcool éthylique bouillant (10 ml, 10 mn) ; une nouvelle extraction est effectuée après broyage (10 ml, 10 mn). Les extraits, concentrés à 5 ml, sont traités par les réactifs habituels en vue du dosage spectrophotométrique. En raison de la très faible coloration jaune développée, la courbe d'adsorption de chaque extrait est étudiée entre 380 et 450 mμ.

a) Réaction dite de « basse énergie »

1re expérience

Chaque essai est pratiqué avec trois godets de 50 graines. L'énergie mesurée à l'aide d'une thermopile G. JACOBSEN et d'un galvanomètre SEFRAM est de 3 300 ergs·cm^{-2}·s^{-1}. L'éclairement est de dix minutes pour le rouge clair et de vingt minutes pour le rouge sombre. Le séjour à l'obscurité, après la période d'éclairement, est de deux jours. Deux essais sont pratiqués pour chaque longueur d'onde.

Les témoins laissés à l'obscurité ne contiennent pratiquement pas de flavonoïdes. Les limbes des plantules éclairées par le rouge clair permettent d'obtenir des valeurs de 30 et 35 mg de flavonoïdes exprimés en isoquercitroside pour 100 g de tissus frais. Les plantules soumises à l'expérience de réversion rouge clair-rouge sombre contiennent des quantités plus modestes de flavonoïdes : 8 et 14 mg (pour 100 g de limbes frais).

2e expérience

La caractérisation des flavonoïdes est assurée par spectrophotométrie avec étude de la courbe d'absorption et mesure à 415 mμ, ainsi que par chromatographie sur papier (solvants S_2 et S_3).

Les résultats sont groupés dans le tableau X où figurent également, à titre de comparaison, les valeurs caractéristiques de plantules de même âge cultivées en « microphytotron » avec un éclairement de 16 000 lx.

L'examen des données montre que la masse des limbes des plantes cultivées à la lumière (Témoins lumière) est largement supérieure à celle des plantules étiolées,

qu'il s'agisse des « Témoins obscurité » ou des plantules éclairées par les différentes radiations, sans que l'on puisse observer d'ailleurs de grandes variations dépendant de la longueur d'onde.

TABLEAU X

Effets de la « réaction de basse énergie » sur la teneur en flavonoïdes des limbes

Teneur exprimée en milligrammes d'isoquercitroside pour 100 g de matière fraîche (TMF) ou sèche (TMS) quantité en nanogrammes par plantule (QP). Les « témoins lumière » (TL) sont cultivés à 16 000 lx en « microphytotron ».

Lumière	Nombre de plantules par essai	Masse des limbes par plantule mg	Flavonoïdes		
			TMF mg	TMS mg	QP ng
Blanche (TL)	20	120	380	2 110	456 000
Nulle	50	4,3	0,9	7,3	39
(TO)	44	4,2	1,6	12,6	67
Violet ..... 422 mμ	49	4,9	6,7	52,8	328
bleu	43	6,0	5,7	45,0	343
Vert .....555 mμ	42	6,0	3,9	31,0	234
	47	6,1	5,5	43,3	335
Jaune .....578 mμ	51	4,4	4,7	37,0	207
	46	7,0	4,9	38,9	343
Rouge clair ...665 mμ	56	5,0	9,0	70,6	450
	41	8,0	10,2	80,1	816
	39	7,6	12,4	97,5	942
Rouge sombre 745 mμ	46	3,8	1,7	13,3	65
	68	2,8	2,1	18,4	65
	64	2,4	1,5	11,5	34
Réversion	50	5,4	3,9	30,7	210
—	46	5,4	3,5	27,6	190
RC-RS	44	4,7	5,1	40,2	240

Au contraire la teneur en flavonoïdes, pratiquement nulle, aux erreurs expérimentales près, chez les « Témoins obscurité » varie considérablement chez les plantes exposées aux diverses radiations ; c'est le rouge clair qui est la lumière la plus active, suivie par le violet bleu et le jaune, tandis que le rouge sombre est inefficace. D'autre part l'expérience de réversion fournit un résultat net : l'exposition à la lumière rouge sombre aussitôt après l'exposition à la lumière rouge clair supprime les effets de celle-ci.

Discussion

A l'obscurité, la biogenèse des flavonoïdes est pratiquement nulle. Elle se produit après illumination brève des plantules étiolées à un niveau d'éclairement trop faible pour intéresser la photosynthèse.

Les effets des diverses radiations sur la croissance des limbes foliaires sont réduites, par rapport à ce qui est observé chez les témoins cultivés à la lumière blanche à 16 000 lx d'une part et chez les témoins cultivés à l'obscurité d'autre part. Les diverses radiations, sauf peut-être celles du rouge sombre, sont équivalentes à ce point de vue. Par contre la lumière rouge clair est de loin la plus efficace pour déclencher la biogenèse des flavonoïdes, si l'on considère aussi bien les teneurs rapportées à 100 g de masse fraîche que celles rapportées à une plantule. L'effet de réversion est nettement observé.

Mais il reste que, dans les conditions opératoires choisies, avec une énergie de 3 300 ergs·cm^{-2}·s^{-1}, les teneurs en flavonoïdes sont très faibles, eu égard à celles que l'on peut observer chez les plantes « Témoins lumière ». Il est utile de rechercher l'effet d'éclairements d'énergie supérieure dans une réaction dite de « haute énergie ».

b) Réaction dite de « haute énergie »

Des plantules étiolées de Capucine sont traitées comme précédemment : les semis restent à l'obscurité absolue pendant la germination, les plantules âgées de trois jours sont alors soumises pendant 24 h à un éclairement par l'une des lumières monochromatiques retenues libérant une énergie de 3 300 ergs·cm^{-2}·s^{-1}, puis replacées pendant 24 h à l'obscurité. Des plantules « Témoins obscurité » sont laissées constamment à l'obscurité ; des plantules « Témoins lumière » sont éclairées pendant 24 h en lumière blanche (5 000 lx). Avant d'être fixées à l'alcool en vue du dosage, les plantules sont mesurées et examinées.

TABLEAU XI

Aspect des plantules étiolées après éclairement de 24 h aux diverses lumières monochromatiques

Lumière	Hauteur de la plantule cm	Longueur de la feuille depuis le nœud mm	Distance entre les bords supérieurs des limbes mm	Couleur des plantules
« Témoins obscurité »	15-17	5	5- 6	Limbes restés jaunes
« Témoins lumière » .	8-9	20-25	10-13	Limbes verts Tiges rouges
Violet bleu	13-16	15-20	15	Limbes et tiges verts
Vert.....	13-14	6	6	Limbes verts
Jaune	10-13	10	6-10	Limbes verts
Rouge clair	14-15	12-15	12	Limbes verts
Rouge sombre	8-10	10-15	6-7	Limbes restéss jaunes

Les effets sur la croissance des limbes sont maximaux avec les lumières violet bleu et rouge clair (tableau XI). Le dosage spectrophotométrique est contrôlé par densitométrie à 365 mμ des taches de chromatographie obtenues sur papier à l'aide du solvant S_2 à 2 %. La teneur en flavonoïdes rapportée à 100 g de matière fraîche ou sèche (tableau XII) est plus élevée après l'action du violet bleu, du rouge clair et du rouge sombre, mais le jaune et le vert sont également efficaces pour déclencher la biogenèse des flavonoïdes. Si l'on rapporte la quantité à une plante, les deux lumières les plus actives sont finalement le violet bleu et le rouge clair.

Tableau XII

Effets de la réaction dite de « Haute énergie » sur la teneur en flavonoïdes des limbes

Teneur exprimée en milligrammes d'isoquercitroside pour 100 g de matière fraîche (TMF) ou sèche (TMS), quantité en microgrammes par plantule (QP). Les « Témoins-lumière » (TL) sont cultivés à 5 000 lx.

Lumière		Nombre de plantules par essai	Masse des limbes par plantule mg	Flavonoïdes		
				TMF mg	TMS mg	QP μg
Blanche (TL)	—	16	102	300	1950	306
Nulle (TO)	—	30	3,8	0,8	6,3	0,03
Violet-bleu	422 mμ	36	19.5	171	1343	32,7
Verte	555 mμ	34	8,2	102	802	8,4
Jaune	578 mμ	41	14,2	113	890	16,0
Rouge clair	665 mμ	27	22,8	147	1158	33,6
Rouge sombre	745 mμ	31	11,5	146	1150	16,8

Discussion

Chez le Pois, variété Alaska, les radiations de la lumière rouge clair stimulent la biosynthèse des flavonoïdes en particulier celle des dérivés du quercétol (Bottomley et *al.*, 1966). Chez les plantules étiolées, ces dérivés sont caractérisés à une plus faible teneur.

La Capucine réagit également à la lumière rouge clair : celle-ci fait apparaître des flavonoïdes qu'il est impossible de caractériser dans les limbes des plantules maintenues à l'obscurité.

En réaction de « basse énergie », l'intervention du système du phytochrome est vérifiée. En réaction de « haute énergie », ce sont les régions violet bleu et rouge du spectre de la lumière visible qui sont les plus actives, comme l'avaient observé déjà Harraschain et Mohr (1963) chez le Sarrasin. En réaction de « haute énergie », il convient de souligner l'effet particulier du rouge sombre qui déclenche une biosynthèse très active des flavonoïdes, dans des limbes restés jaunes. Cette observation confirme l'hypothèse suivant laquelle, chez la jeune plantule, la biosynthèse des flavonoïdes est indépendante de la photosynthèse.

II. ECLAIREMENT EN LUMIÈRE ULTRA-VIOLETTE

Que la lumière violet bleu soit efficace en réaction dite de « haute énergie » et d'autre part que le spectre d'absorption du phytochrome sous sa forme absorbant

dans le rouge clair présente un pic culminant vers 380 mμ (fig. 4) incite à rechercher l'effet éventuel de la lumière ultra-violette proche. Déjà Bassler (1957) observe la présence de flavonoïdes chez les plantules de Sarrasin, éclairées par une lampe à vapeur de mercure. A des plants de Tabac cultivés en pleine terre ou en serre, un supplément de lumière ultra-violette est apporté par une lampe à vapeur de mercure (Lott, 1960) ; cette irradiation supplémentaire provoque une élévation marquée de la teneur en acide chlorogénique et assez discrète de la teneur en rutoside. Mais des effets nocifs sont observés si l'éclairement est excessif. En fait, des expériences significatives dans la région du rayonnement ultra-violet nécessiteraient l'emploi de radiations suffisamment monochromatiques d'énergie connue sur un tissu particulièrement réactif (Siegelman, 1964).

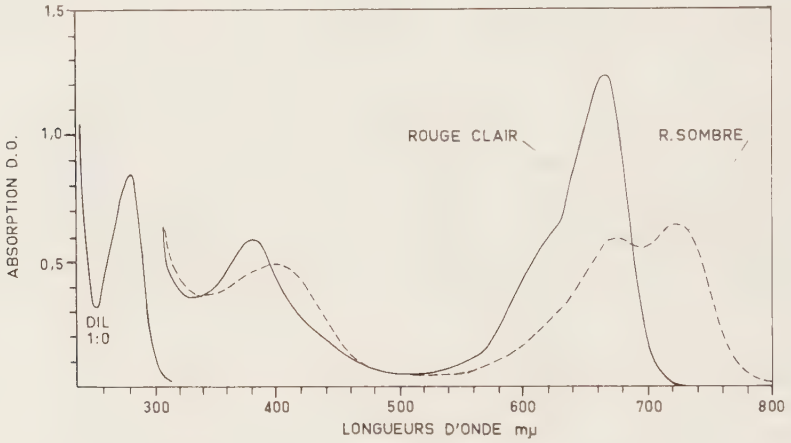


Fig. 4. — Spectre d'absorption du phytochrome sous sa forme absorbant dans le rouge clair et sa forme absorbant dans le rouge sombre.
(D'après Butler, Hendricks et Siegelman, 1965).

Pour des raisons techniques, dans ces premiers essais, ne sont exposés que les effets de radiations de 365 mμ environ. La source est une lampe Madza MA W 125 W, à haute pression avec enveloppe de verre de Wood et écran supplémentaire en verre Ultraviol Sovirel de 5 mm d'épaisseur, sur une surface de 9 dm^2. Cependant cet écran est transparent également au rayonnement rouge sombre de 720 à 810 mμ. L'énergie du rayonnement est de 4 000 ergs$\cdot$cm$^{-2}\cdot$s^{-1}. Les graines sont semées sur compost habituel et la culture est réalisée avec les conditions suivantes : $T = 20^{o} \pm 2\ ^{o}C$, degré hygrométrique # 50 % ; l'obscurité est complète sauf au cours de la période d'irradiation.

Deux séries d'essais sont pratiquées avec une durée d'irradiation de deux minutes, selon le type d'une réaction dite de « basse énergie », et de deux jours, en réaction dite de « haute énergie ». Elles portent sur des plantules âgées de 3 jours.

a) Effets d'une brève irradiation

Comparativement à des témoins restés à l'obscurité, les plantules irradiées pendant deux minutes présentent des tiges et des pétioles moins grêles, des limbes

plus développés, d'un jaune assez soutenu, dont la teneur en matière sèche est de 12 %. Des flavonoïdes peuvent être mis en évidence dans les limbes de ces dernières plantes à l'aide de la chromatographie sur papier (solvants S_2 et S_4) et par l'étude de la courbe d'absorption de l'extrait purifié de limbes. Les résultats du dosage sont rapportés dans le tableau XIII.

TABLEAU XIII

Effets d'une brève irradiation de plantules, par la lumière ultra-violette

Teneur en flavonoïdes des limbes exprimée en milligrammes d'isoquercitroside pour 100 g de matière fraîche (TMF) ou sèche (TMS) quantité en µg par plantule (QP).

Les « Témoins-lumière » (TL) ont été exposés pendant 24 h à la lumière blanche de tubes fluorescents (16 000 lx). Les « Témoins obscurité » (TO) sont restés constamment à l'obscurité.

Lumière	Nombre de plantules par essai	Masse des limbes par plantule mg	Flavonoïdes		
			TMF mg	TMS mg	QP µg
Blanche (TL)	20	120	380	2110	450
Nulle (TO)	47	4,4	1,6	12,6	0,07
U.V.	20	12	22	184	2,6
	20	13	26	216	3,4
	20	15	40	334	6,0
	20	13	30	250	3,9

b) Effets d'une irradiation prolongée

Les plantules, qui ont été irradiées pendant deux jours, présentent un aspect très particulier : tiges et pétioles sont assez trapus et pigmentés en jaune et en rouge ; le diamètre des limbes atteint 5 mm ; leur couleur est jaune vert. Enfin les plantules

TABLEAU XIV

Effets d'une irradiation prolongée de plantules, par la lumière ultra-violette

Teneur en flavonoïdes des limbes exprimée en milligrammes d'isoquercitroside pour 100 g de matière fraîche (TMF) ou sèche (TMS) quantité en µg par plantule (QP).

Les « Témoins-lumière » (TL) ont été exposés pendant 24 h à la lumière blanche de tubes fluorescents (16 000 lx). Les « Témoins-obscurité » (TO) sont restés constamment à l'obscurité.

Lumière	Nombre de plantules par essai	Masse des limbes par plantule mg	Flavonoïdes		
			TMF mg	TMS mg	QP µg
Blanche (TL)	20	120	380	2110	450
Nulle (TO)	47	4,4	1,6	12,6	0,07
U.V.	18	26,3	56	343	14,7
	23	26,8	55	337	14,7
	20	24,8	49	300	12,1
	25	17,2	79	484	13,6
	31	22,6	62	380	14,0

sont courbées vers la source, marquant un net effet de phototropisme positif. Par chromatographie, il est possible de caractériser des flavonoïdes qui, en première analyse, ne paraissent pas différents de Fv B et Fv A. Les résultats des dosages sont réunis dans le tableau XIV.

Discussion

Dans les conditions opératoires retenues, les plantules irradiées par la lumière ultra-violette dont la bande passante principale se situe à 365 mμ, ne paraissent pas souffrir particulièrement. Les tiges des plantules traitées sont plus courtes que celles des témoins, conformément à l'observation de KLEIN, ESDAL et GENTILE (1965). Un effet de phototropisme positif a déjà été noté pour les feuilles de plantules d'Avoine (CURRY, THIMANN et RAY, 1956), empruntant le mécanisme habituel de la régulation auxinique (ZEEUW et LEOPOLD, 1957). D'autre part, les radiations ultra-violettes proches entraînent à la fois un « effet morphogénétique » et un effet de déclenchement de la biogenèse des flavonoïdes ; mais le premier est beaucoup plus net avec la lumière ultra-violette qu'avec les diverses radiations visibles. Après irradiation de 48 h à 3 300 ergs·cm^{-2}.s^{-1}, les limbes présentent une coloration jaune vert et il est permis de supposer que la photosynthèse s'est déjà installée, produisant des précurseurs utilisés dans la biogenèse des flavonoïdes. D'après MCLEOD et KANWISHER (1962) et HALLDAL (1964), une activité photosynthétique peut avoir lieu dès 360 mμ. Au contraire, dans l'expérience d'irradiation de courte durée avec 396 000 ergs·cm^{-2}, les limbes restent jaunes. Il semble donc que biogenèse des flavonoïdes et photosynthèse soient deux phénomènes indépendants comme dans les réactions en lumière visible où le phytochrome est impliqué.

Ces expériences semblent donc vérifier que l'irradiation par un rayonnement de plus courte longueur d'onde que la lumière violet-bleu habituellement utilisée, conduit à des résultats de même ordre qu'avec cette dernière. En effet, en réaction dite de « haute énergie », le rayonnement ultra-violet, situé dans les radiations de longueur d'onde plus courte, provoque des effets analogues à ceux de la lumière violet bleu à 442 mμ : « effets morphogénétiques » avec stimulation de la croissance des limbes et déclenchement de la biogenèse des flavonoïdes. Mais en réaction dite de « basse énergie », l'efficacité de la lumière ultra-violette paraît bien supérieure à celle de la lumière violet bleu. Il convient toutefois de rappeler que, malgré les précautions prises, la source émet un rayonnement dans le rouge sombre entre 720 et 810 mμ, peut-être capable de perturber l'interprétation des présentes recherches.

III. UTILISATION DE PRÉCURSEURS MARQUÉS

Selon les conceptions actuelles (GEISSMAN, 1962 ; GRISEBACH, 1965), l'hypothèse de ROBINSON (1936), reprise et modifiée par BIRCH et DONOVAN (1953), reste valable : dans la biogenèse des flavonoïdess, le noyau phényle A de la chromone provient de l'enchaînement d'unités malonyl-coenzyme A (LYNEN et TADA, 1961 ; GRISEBACH, 1965) avec aromatisation, tandis que le noyau phényl B est apporté par un corps de la série cinnamique (fig. 5). Chez le Sarrasin, cette hypothèse est vérifiée et les précurseurs du noyau B les plus efficaces sont l'acide shikimique, l'acide p-hydroxycinnamique et la L-phénylalanine (UNDERHILL, WATKIN et NEISH, 1957).

Un stade intermédiaire serait la formation d'une chalcone en $C_6-C_3-C_6$ (fig. 6), siège de modifications de détail sur le noyau B, telles qu'une o-hydroxylation

dans le cas du quercétol, puis d'une flavanone donnant par oxydation un dihydroflavanonol, plaque tournante conduisant chez le Sarrasin aussi bien au flavonol qu'à l'anthocyane (Grisebach et Bopp, 1959). Le stade ultime serait la fixation d'une chaîne glucidique par liaison osidique, l'ose étant apporté sous forme d'uridine diphosphate de glucose en présence d'un enzyme spécifique. La synthèse des triglucosides se ferait par fixation successive des trois molécules d'ose (Harborne, 1963, 1966).

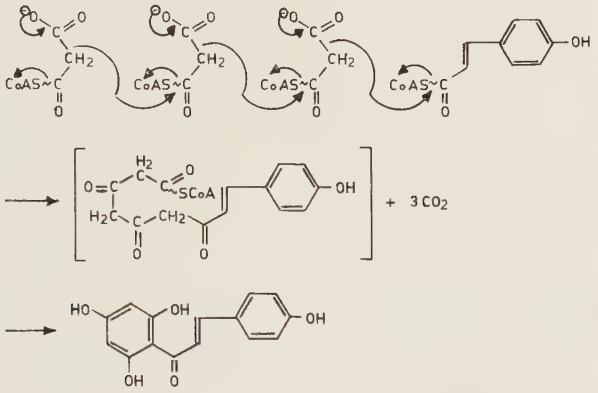


Fig. 5. — Formation hypothétique d'une chalcone à partir de p-coumaryl-CoA et de malonyl CoA. (D'après Grisebach, *in* Goodwin, 1965).

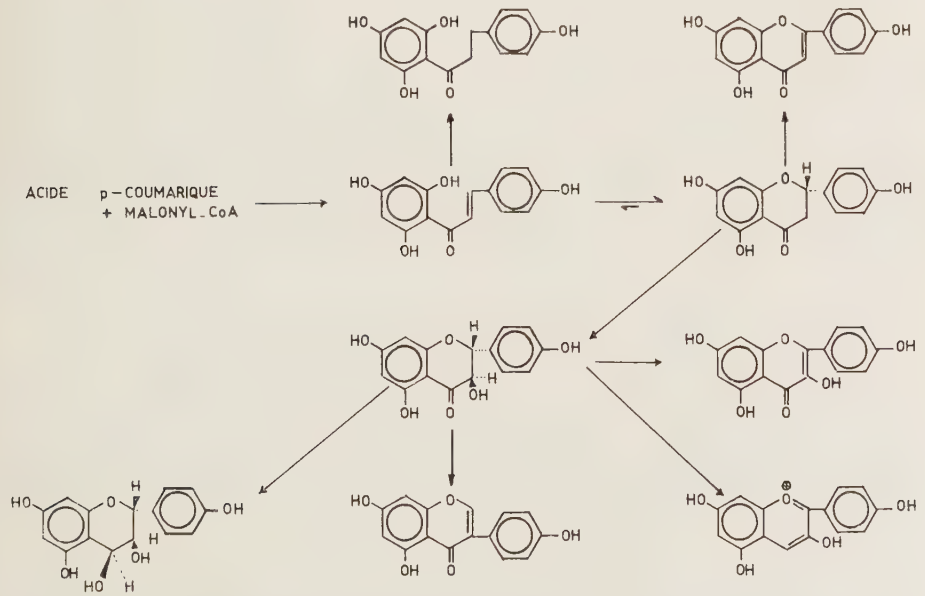


Fig. 6. — Conversion de dihydroflavanonols en flavonols, anthocyanes et flavanne - 3,4 diols (D'après Grisebach, *in* Goodwin, 1965).

Deux expériences sont réalisées au Laboratoire de Biologie végétale du CNRS à Bellevue-Meudon, concernant l'utilisation de DL-phénylalanine marquée par des feuilles excisées.

Des plantules de 6 jours cultivées en « microphytotron » à un éclairement de 5 000 lx fournissent des feuilles que l'on excise avec la partie supérieure de leur pétiole (1 cm environ). Le moignon de pétiole plonge dans une solution de DL-phénylalanine marquée en 3 au ^{14}C, d'activité spécifique 12 microcuries par millimole, dont 6,9 mg sont dissous dans 100 ml d'eau distillée.

1re expérience

Les limbes reçoivent la lumière blanche directe de lampes-ballons fluorescents Mazdafluor Blanc super (environ 20 000 ergs) et une irradiation supplémentaire par rayons ultra-violets selon le dispositif déjà décrit qui donne 3 000 ergs·cm^{-2}·s^{-1}. Soixante quinze limbes, de diamètre compris entre 15 et 23 mm, de masse totale 2,2 g, sont ainsi éclairés pendant 48 h.

2e expérience

Quatre-vingt-deux limbes de diamètre compris entre 18 et 28 mm, de masse totale 5,2 g sont éclairés pendant 48 h par une lumière verte, obtenue à partir des mêmes lampes que dans la première expérience et filtrée à l'aide d'un écran en rhodoïd de transparence maximale à 530 mμ fournissant environ 20 000 ergs.

Une ventilation convenable disperse la chaleur produite par les lampes et empêche les limbes de se dessécher. Après 48 h d'éclairement, les limbes sont excisés soigneusement et fixés à l'alcool méthylique bouillant. Après broyage, le résidu est soumis à une seconde extraction. L'extrait alcoolique filtré est privé de solvant par distillation sous pression réduite. Le résidu est traité par 5 ml d'eau et 20 ml de mélange chloroforme-hexane 1-2(v/v). Après agitation soigneuse, deux phases se séparent : la phase chloroforme-hexane supérieure, colorée en vert, la phase aqueuse inférieure colorée en jaune rougeâtre. Chacune d'elles est lavée avec de nouvelles quantités de solvant (eau pour l'une, chloroforme-hexane pour l'autre). Puis la phase aqueuse est acidifiée par l'acide sulfurique dilué jusqu'à pH 4,0 et traitée par de l'acétate d'éthyle (2 ml, 10 fois) ; ce solvant extrait les flavonoïdes à un état assez pur. Les résultats enregistrés avec un appareil Tracerlab (Versamatic 2, Compteur FD 1 à fenêtre ultra-mince de 0,15 mg/cm^2, Château de plomb SH1 ; rendement du compteur : 30 %) sont les suivantes :

1re expérience

Fraction chloroforme - hexane : $4{,}25 \cdot 10^5$ impulsions par minute
Fraction aqueuse : $1{,}7 \cdot 10^6$ impulsions par minute
Fraction acétate d'éthyle : $3{,}3 \cdot 10^6$ impulsions par minute

Cette dernière fraction contient les flavonoïdes (dosés par spectrophotométrie selon le procédé habituel ; 9 mg exprimés en isoquercitroside). Le rendement de l'utilisation de la phénylalanine de cette fraction est de 1,3 % par rapport à la quantité de cet acide aminé absorbé.

2e expérience

Fraction chloroforme - hexane : $4{,}0 \cdot 10^5$ impulsions par minute
Fraction aqueuse : $1{,}3 \cdot 10^6$ impulsions par minute
Fraction acétate d'éthyle : $3{,}2 \cdot 10^5$ impulsions par minute

Cette dernière fraction montre un rendement de 1,6 % par rapport à la quantité de phénylalanine absorbée, compte tenu des conditions opératoires et contient 5,1 mg de flavonoïdes exprimés en isoquercitroside.

En comparant les rapports de la radioactivité spécifique de la fraction des flavonoïdes contenus dans la fraction acétate d'éthyle à celle de la phénylalanine fournie, on a : 0,8 % dans le 1er cas, 0,66 % dans le second. En admettant que l'activité de la fraction acétate d'éthyle est due pour sa plus grande partie aux flavonoïdes, il est possible de calculer, selon PHAN CHON TON (1961), la radioactivité spécifique moléculaire (rapport de l'activité spécifique molaire de la phénylalanine fournie) : sur 40 molécules de phénylalanine fournies, 8 ont été converties en flavonoïdes en lumière blanche supplémentée de lumière UV, 3 seulement en lumière verte.

Discussion

Il est prouvé, par l'étude de l'extrait fractionné et par celle des chromatogrammes obtenus avec celui-ci, que le carbone 3 de la phénylalanine est utilisé dans la biogenèse du flavonoïde. Probablement, seule la L-phénylalanine est-elle utilisée. Cette conversion est plus intense en lumière blanche accompagnée de lumière ultraviolette de $\lambda = 365$ mμ qu'en lumière verte, conformément aux résultats précédemment obtenus sous l'effet d'une irradiation prolongée. Les teneurs en flavonoïdes, formés dans ces conditions, varient dans le même sens.

IV. SORT ET ROLE POSSIBLE DES FLAVONOIDES

Sur des pieds de Capucine cultivés en pleine terre et bien ensoleillés, les feuilles de la base jaunissent. Leur teneur en flavonoïdes est voisine de celles des feuilles restées vertes. Les flavonoïdes présents dans les limbes foliaires ne subissent-ils pas de processus de dégradation au cours de la sénescence et de la mort des feuilles ?

A partir d'une culture en pleine terre, sont récoltées, au stade de la floraison, des feuilles de grande taille, formant un lot homogène. L'expérience est répétée plusieurs fois au cours d'une période de trois semaines. Chaque fois, une partie du lot est traitée aussitôt en vue du dosage, ce qui constitue un témoin de durée de survie = 0 ; l'autre partie est maintenue en survie. Pour cela, ces feuilles sont détachées et les pétioles sont sectionnés à 1 cm du niveau d'insertion des limbes. Les moignons plongent dans du liquide de KNOP. Les feuilles sont laissées à l'obscurité absolue, dans des caissons aérés ($T = 18° \pm 2$ °C, degré hygrométrique # 50 %), pendant une durée pouvant aller jusqu'à 250 h. A partir de 200 h apparaît un jaunissement partiel qui se généralise vers 250 h, annonçant la mort des limbes foliaires.

Aucun polyphénol n'est caractérisé dans les bains de liquide de KNOP. La teneur en flavonoïdes des limbes, mesurée par spectrophotométrie, est rapportée au matériel frais ou sec (tableau XV).

Chez les témoins, du début à la fin des expériences (15 septembre-10 octobre), une décroissance est observée, probablement en rapport avec le processus de floraison et aussi avec la diminution progressive de la durée d'ensoleillement et la baisse de la température moyenne. Au cours de la survie à l'obscurité, la teneur en flavonoïdes pour 100 g de matière fraîche décroît progressivement, mais la teneur en matière sèche décroît également par effet d'inanition qui doit provoquer la consommation des glucides, puis des protides, chez la Capucine comme chez d'autres plantes (MOYSE, 1951). Rapportée à la matière sèche, cette teneur reste à peu près constante aux erreurs d'expériences près. Seule est abaissée la teneur vers 250 h, mais il est alors

difficile de parler de « survie ». La pesée des limbes avant et après séjour à l'obscurité montre une légère perte de masse qui atteint 8 % après 200 h. Ainsi enregistre-t-on une diminution de la masse totale des constituants des limbes y compris, pour une part modérée, celle des flavonoïdes.

TABLEAU XV

Teneur en flavonoïdes des feuilles en survie

Teneur des limbes exprimée en mg d'isoquercitroside pour 100 g de matière fraîche (TMF) ou sèche (TMS).

Heures de survie	Matière sèche %	Nombre d'essais	Flavonoïdes	
			TMF mg	TMS mg
0	15,5	5	270 (40)	1741 (258)
200	11,0	4	231 (33)	2100 (300)
0	15,4	10	244 (24)	1584 (157)
250	10,3	10	112 (18)	1088 (179)
0	15,4	10	183 (13)	1190 (77)
170	12,6	10	152 (12)	1206 (98)
215	12,2	10	151 (12)	1238 (102)
0	15,1	10	186 (12)	1230 (79)
70	15,0	10	185 (13)	1230 (87)

Il convient de noter que le dosage spectrophotométrique porte sur la partie quercétol de la molécule des hétérosides présents et ne permet pas de juger si la chaîne glucidique insérée en 3 est consommée par la feuille en inanition. Mais à l'aide de la chromatographie sur papier utilisant les solvants S_3 et S_4, il n'est pas possible de mettre en évidence de différence appréciable entre les proportions d'hétérosides Fv A et Fv B des feuilles en inanition et des feuilles récoltées dans les conditions habituelles. Le quercétol libre n'est jamais observé. Ceci s'accorde avec l'idée que la copule glucidique des hétérosides n'a, dans la cellule végétale, qu'un rôle accessoire assurant en particulier la solubilisation de la génine.

E. CONCLUSIONS GÉNÉRALES

De cette étude partielle des flavonoïdes de la Grande Capucine peuvent être dégagées les conclusions suivantes.

1) Préalablement aux recherches d'ordre physiologique, l'inventaire des polyphénols est dressé. Dans les tiges, pétioles et limbes foliaires, sont observés, en chroma-

tographie sur papier, des flavonoïdes Fv A et Fv B et un acide chlorogénique. Un procédé classique d'extraction par l'alcool bouillant ne permet d'isoler des feuilles fraîches que Fv A, identifié à l'isoquercitroside ou quercétol 3-glucoside. Ce produit apparaîtrait comme un artefact. Pour obtenir Fv B, extrêmement fragile, un procédé original d'extraction à froid a été proposé. Paraissant nouveau à notre connaissance, Fv B serait soit un quercétol 3-triglucoside soit un quercétol 3-glucoside 7-diglucoside. Il se rangerait dans la catégorie des hétérosides primaires observés par chromatographie chez diverses plantes, mais non encore isolés. Fv A se forme, malgré les précautions prises au cours du traitement des organes, par hydrolyse partielle du triglucoside Fv B. La fragilité exceptionnelle de celui-ci n'a pu être expliquée.

Beaucoup d'autres molécules, déjà décrites, n'existent pas réellement dans les tissus vivants, mais résultent d'une dégradation partielle de substances natives très labiles et difficiles à isoler.

2) Pour doser les flavonoïdes, deux méthodes sont proposées. L'une est basée sur la densitométrie des taches obtenues par chromatographie sur papier. Mais à cette microméthode délicate, il est préféré la spectrophotométrie des chélates que forment avec le chlorure d'aluminium les flavonoïdes Fv A et Fv B. La méthode retenue est sensible, fidèle et susceptible d'applications en série. Les deux hétérosides Fv A et Fv B présentant le même coefficient d'extinction moléculaire dans les conditions opératoires, le dosage global n'est pas entaché d'erreur. Les résultats sont exprimés en isoquercitroside.

La répartition des flavonoïdes chez la tige et la feuilles est inégale : les limbes sont quelque 30 fois plus riches que les tiges et 20 fois plus que les pétioles aux divers stades du développement et contiennent toujours entre 83 et 95 % de l'ensemble des flavonoïdes d'une plante. Au cours de cultures en pleine terre ou en « microphytotron », on constate que : 1° la teneur en flavonoïdes, rapportée à l'unité de masse fraîche ou sèche, s'élève très vite aussitôt après la levée de la graine, dans la tige et les feuilles ; cette teneur est maximale dans les limbes entre le 6e et le 15e jours, puis décroît progressivement et, dès l'épuisement des cotylédons, reste en plateau jusqu'à la fructification ; 2° la teneur par plante subit une variation affectant une courbe en S calquée sur la courbe de variation de la masse des limbes ou de la plante entière. Il n'a pas été enregistré de variations nycthémérales de la teneur en flavonoïdes ni de modifications au cours du flétrissement.

3) Soumises à des variations d'éclairement en lumière blanche, les plantes réagissent par des modifications morphologiques et par des variations marquées de la teneur en flavonoïdes. Chez des plantules comportant de 5 à 7 feuilles, la teneur rapportée à l'unité de masse fraîche ou sèche passe du simple au double si l'éclairement varie de 4 000 à 16 000 lx. Cet effet de la lumière est probablement en rapport avec les processus de la photosynthèse qui assurent la formation des précurseurs des flavonoïdes.

Chez des plantules très jeunes au contraire, à d'importantes variations d'éclairement, de 160 à 16 000 lx, ne correspondent que de faibles variations de teneur en flavonoïdes. Tout se passe comme si un stimulus lumineux d'une intensité minimale était nécessaire pour déclencher la biogenèse des flavonoïdes qui n'a pas lieu à l'obscurité. Ceux-ci apparaissent déjà, en faible quantité il est vrai, après un éclairement bref (15 s pour 1 000 lx).

Des expériences utilisant des radiations monochromatiques de la lumière visible conduisent à admettre l'intervention du phytochrome dans le déclenchement de la biogenèse des flavonoïdes. En réaction dite de « basse énergie », les radiations rouge

clair sont efficaces, et leur effet est supprimé par exposition ultérieure des plantes étiolées au rouge sombre (réversion). En réaction dite de « haute énergie », le rouge clair et le violet bleu sont également efficaces. Il n'a pas été observé de variation qualitative des flavonoïdes. Les radiations UV, à 365 mμ, qui intéressent également l'absorption du phytochrome sous sa forme absorbant dans le rouge clair, déclenchent pareillement la biogenèse des flavonoïdes chez des plantules étiolées. Cette observation paraît étendre le champ d'étude des propriétés du phytochrome.

Ni l'élévation de la température à 30 °C, ni l'apport de saccharose aux limbes foliaires ne sont capables de provoquer la biogenèse à l'obscurité complète.

L'utilisation de la DL-phénylalanine marquée pour la biogenèse des flavonoïdes est nettement plus importante lorsque les limbes foliaires sont éclairés de lumière blanche enrichie de radiations UV que lorsqu'il s'agit de lumière verte, en réaction dite de « haute énergie ».

Des greffes interspécifiques, entre le *Tropaeolum majus* L. utilisé et le *T. peregrinum* L., permettent de conclure que les flavonoïdes se forment sur place, dans les limbes en particulier, et ne subissent pas de transport (Delaveau, 1964).

4) Le rôle des flavonoïdes de la Capucine est difficile à préciser. La teneur en flavonoïdes des limbes, rapportée à 100 g de matière sèche ou à la masse fraîche initiale, n'est guère modifiée chez des feuilles en inanition. S'il n'est donc pas prouvé que Fv B, malgré la présence de trois glucosyles dans sa molécule, participe au métabolisme général en tant que glucide, peut-être faudrait-il lui attribuer un rôle dans les phénomènes d'oxydo-réduction, dans la solubilisation d'éléments minéraux (Delaveau et Paris, 1961 ; Stenlid, 1961) comme facteur de croissance (Nitsch, 1961, 1963 ; Nitsch et Paris, 1962 ; Stenlid, 1963 ; Zucker, Nitsch et Nitsch, 1965).

Mais au cours de ce travail d'ensemble sur les flavonoïdes de la Grande Capucine, il nous est apparu que plusieurs données mériteraient d'être rapprochées. Les flavonoïdes de la Capucine rattachés au quercétol, accessoirement au kaempférol dans le cas des fleurs, sont avant tout des pigments jaunes (Shibata, 1916), absorbant dans l'ultraviolet vers 260 et 360 mμ. Ils sont formés sur place, sans transport, et paraissent localisés aux tissus assimilateurs. Ils sont synthétisés dans la jeune plantule indépendamment de la photosynthèse et avant qu'elle ne soit déclenchée. Chez la plante suffisamment évoluée, la teneur en flavonoïdes est fonction de l'intensité de l'éclairement en lumière blanche. Localisés aux organes aériens, ils sont d'autant plus abondants que les tissus sont plus jeunes et mieux exposés à la lumière. Des recherches ultérieures permettront peut-être de préciser le sort de l'énergie lumineuse absorbée par les flavonoïdes et de généraliser éventuellement les observations effectuées chez la Capucine.

REMERCIEMENTS

J'assure de ma respectueuse gratitude MM. les Professeurs P. Chouard, R. Ulrich et R. Paris qui m'ont prodigué leurs conseils et MM. R. Jacques et Phan Chon Ton qui m'ont aimablement aidé dans la réalisation de plusieurs expériences.

BIBLIOGRAPHIE

AHLGRIMM E.-D., 1956 – Beiträge zur Frage der Biogenese sekundärer Stoffwechselprodukte dargestellt an *Mentha piperita* L. und an *Fagopyrum* Arten. *Planta*, **47**, 255-298.

BASSLER R., 1957 – Der Einfluss ökologischer und ontogenetischer Faktoren auf die Flavone von *Fagopyrum sagittatum* Gilib., *Pharmazie*, **12**, 758-772.

BOTTOMLEY W., SMITH H. et GALSTON A.W., 1966 – Flavonoid complexes in *Pisum sativum* III. The effect of light on the synthesis of kaempferol and quercetin complexes. *Phytochemistry*, **5**, 117-124.

BRIGGS W.R. et SIEGELMAN H.W., 1965 – Distribution of phytochrome in etiolated seedlings. *Plant Physiol.*, **40**, 934-941.

BRODFÜHRER U., 1955 – Der Einfluss einer abgestuften Dosierung von ultravioletter Sonnenstrahlung auf das Wachstum der Pflanzen. *Planta*, **45**, 1-56.

BUTLER W.L., HENDRICKS S.B. et SIEGELMAN H.W., 1965 – Purification and properties of phytochrome. In *Chemistry and biochemistry of plant pigments*, T. GOODWIN éd., Academic Press, New York et Londres, 197-210.

CLAIR G., DELAVEAU P.G. et PARIS R.R., 1964 – Sur le métabolisme des pigments flavoniques. Répartition chez le *Sinapis alba* L. et influence de la lumière. *Bull. Soc. bot. Fr.*, **111**, 215-218.

CURRY G.M., THIMANN K.V. et RAY P.M., 1956 – The base curvature response of *Avena* seedlings to ultra violet. *Physiol. Plantarum*, **9**, 429-440.

DELAVEAU P., 1964 – Essai de localisation de la biogenèse des flavonoïdes dans le genre *Tropaeolum*. Isolement du rutoside du *T. peregrinum* L. *C.R. Acad. Sc.*, **258**, 318-320.

DELAVEAU P., 1965 *a* – Sur la répartition des pigments flavoniques chez la Grande Capucine. *C.R. Acad. Sc.*, **260**, 1469-1471.

DELAVEAU P., 1965 *b* – Variation de la teneur en pigments flavoniques au cours du développement chez le *Tropaeolum majus* L. *C.R. Acad. Sc.*, **260**, 4815-4817.

DELAVEAU P., 1966 – Dosage des pigments flavoniques chez les végétaux. *Produits et Problèmes pharmaceutiques*, **21**, 164-167.

DELAVEAU P., 1967 – Les flavonoïdes en physiologie végétale. *Anais da faculdade da farmácia do Pôrto*. (à paraître).

DELAVEAU P. et PARIS R., 1961 – Importance physiologique des composés polyphénoliques et en particulier, des flavonoïdes. *Bull. Soc. fr. Physiol. vég.*, **7**, 24-33.

ESDORN I. et NÖLL G., 1955 – Untersuchungen über tagesperiodische Schwankungen im Gehalt an Flavanolen bei *Fagopyrum*-Arten. *Planta*, **45**, 376-378.

FUKUCHI G. et IMAI K., 1950 – Constituents of folium ketsumei. *J. Pharm. Soc. Japan.*, **70**, 568-569, *in Chem. Abstr.*, 1951, **45**, 3999.

FURUYA M., 1962 – Isolation and partial identification of flavonoids complexes controlling IAA-oxidase activity in peas. *Ph. Thesis*, Yale Univ.

FURUYA M. et GALSTON A.W., 1961 – Effect of in vitro preincubation with cofactors on the activity of the indoleacetic acid oxidase of peas. *Physiol. Plantarum.*, **14**, 750-766.

FURUYA M. et GALSTON A.W., 1965 – Flavonoid complexes in *Pisum sativum* L. I. Nature and distribution of the major components. *Phytochemistry*, **4**, 285-296.

FURUYA M., GALSTON A.W. et STOWE B.B., 1962 – Isolation from peas of cofactors and inhibitors of indolyl-3-acetic oxidase. *Nature*, **193**, 456-457.

FURUYA M. et HILLMAN W.S., 1964 – Observations on spectrophotometrically assayable phytochrome in vivo in etiolated *Pisum* seedlings. *Planta*, **63**, 31-42.

FURUYA M. et THOMAS R.G., 1964 – Flavonoid complexes in *Pisum sativum*. II. Effects of red and far-red light on biosynthesis of kaempferol complexes and on growth of etiolated plumules. *Plant Physiol.*, **39**, 634-42.

FURUYA M. et TORREY J.G., 1964 – The reversible inhibition by red and far red light of auxin-induced lateral root-initiation in isolated pea roots. *Plant Physiol.*, **39**, 987-991.

GEISSMAN T., 1962 – The chemistry of flavonoid compounds. Pergamon Press, Oxford, Londres, New York, Paris.

GRILL R., 1965 – Photocontrol of anthocyanin formation in turnip seedlings. I. Demonstration of phytochrome action. *Planta*, **66**, 293-300.

GRILL R. et VINCE D., 1965 – Photocontrol of anthocyanin formation in turnip seedlings. II. The possible role of phytochrome in the response to prolonged irradiation with far-red or blue light. *Planta*, **67**, 122-135.

GRILL R. et VINCE D., 1966 – III The photoreceptors involved in the responses to prolonged irradiation. *Planta*, **70**, 1-12.

GRISEBACH M., 1965 – Biosynthesis of flavonoids. In *Chemistry and biochemistry of plants pigments*, T. GOODWIN éd., Acad. Press, New York et Londres, 281-290.

GRISEBACH H. et BOPP M., 1959 – Untersuchungen über den biogenetischen Zusammenhang zwischen Quercetin und Cyanidin beim Buchweizen mit Hilfe ^{14}C-markierter Verbindungen. *Z. Naturforsch.*, **14**^{b}, 485-490.

HALLDAL P., 1964 – Ultraviolet action spectra of photosynthesis and photosynthetic inhibition in a green and a red alga. *Physiol. Plantarum*, **17**, 414-421.

HANSON K.R. et ZUCKER M., 1963 – The biosynthesis of chlorogenic acid and related-conjugates of the hydroxycinnamic acids. *J. biol. Chem.*, **238**, 1105-1115.

HARBORNE J.B., 1963 – Flavonoid sophorosides. *Experientia*, **19**, 7-8.

HARBORNE J.B., 1964 – Phenolic glycosides and their natural distribution. In *Biochemistry of phenolic compounds*, J.B. HARBORNE éd., Academic Press, New York et Londres, pp. 135-136.

HARBORNE J.B., 1956 – *Comparative biochemistry of the flavonoids*. Acad. Press éd. New York et Londres, p. 62.

HARBORNE J.B. et SHERRATT H.S.A., 1961 – Plant polyphenols. 3-Flavonoid in genotypes of *Primula sinensis*. *Biochem. J.*, **78**, 298-306.

HARRASCHIAN H. et MOHR H., 1963 – Der Einfluss sichtbarer Strahlung auf die Flavonoid-Synthese und Morphogenese der Buchweizen Keimlinge (*Fagopyrum esculentum* Moench). II. Flavonolsynthese und Hypokotylwachstum. *Z. Botanik*, **51**, 277-299.

HARTMANN K.M., 1966 – A general hypothesis to interpret « High energy phenomena » of photomorphogenesis on the basis of phytochrome. *Photochem. Photobiol.*, **5**, 349-366.

HEATH O.V.S. et VINCE D., 1962 – Some non photo-synthetic effects of light on higher plants with special reference to wavelength. In *Symposia of the Society for experimental Biology* XVI - *Biological receptor mechanism*, University Press, Cambridge, p. 116.

HILLMAN W.S. et GALSTON, 1957 – Inductive control of indoleacetic acid oxidase activity by red and near infrared light. *Plant Physiol.*, **32**, 129-135.

HOPKINS W.G. et HILLMAN W.S., 1965 – Phytochrome changes in tissues of dark grown seedlings representing various photoperiodic classes. *Amer. J. Bot.*, **52**, 427-432.

JACQUES R., CHABBAL R., CHOUARD P. et JACQUINOT P., 1964 – Mise au point d'un illuminateur spectral à usage biologique. *C.R. Acad. Sc.*, **259**, 1581-1584.

JURD L. et HOROWITZ R.M., 1957 – Spectral studies on flavonols. The structure of Azelein. *J. org. Chem.*, **23**, 1618-1622.

KLEIN R.M., EDSALL P.C. et GENTILE A.C., 1965 – Effects of near ultra-violet and green radiations on plant growth. *Plant Physiol.*, **40**, 903-906.

LOTT H.V., 1960 – Über den Einfluss der kurzwelligen Strahlung auf die Biosynthese der pflanzlichen Polyphenole. *Planta*, **55**, 480-495.

LYNEN F. et TADA M., 1961 – Die biochemischen Grundlagen der « Polyacetat-Regel ». *Angew. Chem.*, **73**, 513-519.

MCLEOD G.C. et KANWISCHER J., 1962 – The quantum efficiency of photosynthesis in ultra-violet light. *Physiol. Plantarum*, **15**, 581-586.

MASCRÉ M. et PARIS R., 1936 – Recherches biochimiques et pharmacologiques sur le rutoside. *Bull. Sc. pharm.*, **43**, 279-282.

MOHR H., 1964 – The control of plant growth and development in light. *Biol. Rev.*, **39**, 87-112.

MOYSE A., 1951 – Respiration et métabolisme azoté. *Thèse Doct (Etat) Sc. nat.* Hermann éd., Paris.

MUMFORD F.E., SMITH D.H. et CASTLE J.E., 1961 – An inhibitor of indole-acetic acid oxidase from pea tips. *Plant Physiol.*, **36**, 752-756.

NGUYEN HIEP, DELAVEAU P. et PARIS R.R., 1964 – Sur la dessiccation et la stabilisation des plantes médicinales. I. Plantes à hétérosides flavoniques. *Ann. Pharm. fr.*, **22**, 573-580.

NICK E., 1953 – Beiträge zum Physiologie der Gerbstoffe und Flavonfarbstoffe bei *Polygonum bistorta* L. *Pharmazie*, **8**, 940-950.

NITSCH J.P. et NITSCH C., 1961 – Synergistes naturels des auxines et des gibbérellines. *Bull. Soc. bot. Fr.*, **108**, 349-362.

NISTCH J.P. et NITSCH C., 1962 – Composés phénoliques et croissance végétale. *Ann. Physiol. vég.*, **4**, 211-225.

NITSCH J.P. et PARIS R., 1962 – Action de flavonoïdes sur la croissance des tissus de Topinambour cultivés in vitro. *Bull. Soc. Bot. Fr.*, **109**, 113-115.

NÖLL G., 1955 – Untersuchungen über den Einfluss verschiedener Faktoren auf den Flavonol Gehalt von *Fagopyrum esculentum* (L) Moench und *Fagopyrum tataricum* (L.). Gärtner. *Pharmazie*, **10**, 609-615 ; 679-692.

OSHIMA Y. et NAKABAYASHI T., 1954 – Partition Chromatography of tannins and pigments-XVI - Catechins and pigments in tea leaves. *J. agr. Chem. Soc. Japon*, **27**, 754-756.

PARIS R. et BEAUQUESNE L., 1950 – Les dérivés flavoniques. *Ann. Pharm. fr.*, **8**, 322-349.

PARIS R. et DELAVEAU P., 1961 – Isolement d'un flavonoïde, identifié à l'isoquercitrin, à partir des feuilles de la Capucine. *C.R. Acad. Sc.*, **252**, 1510-1511.

PARIS R. et DELAVEAU P., 1962 – Isolement d'un hétéroside flavonique identifié à l'astragaline des feuilles de la Moutarde blanche (*Sinapis alba* L). *Lloydia*, **25**, 151-155.

PARTRIDGE S.M., 1946 – Application of the paper partition chromatogram to the qualitative analysis of reducing sugars. *Nature*, **158**, 270-271.

PHAN CHON TON, 1961 – Contribution à l'étude de la production d'éthylène par le *Penicillium digitatum* Sacc. *Thèse Doct. (Univ.) Sc. Nat.*, Paris.

PRICE L. et KLEIN W.H., 1961 – Red, far-red response and chlorophyll synthesis. *Plant Physiol.*, **36**, 733-735.

ROBINSON R., 1936 – Formation of anthocyanins in plants. *Nature*, **137**, 172-173.

ROBERTS E.A.H., CARTWRIGHT R.A. et WOOD D.J., 1956 – The flavonols of tea. *J. Sc. Food Agric.*, **7**, 637-646.

ROLLIN P., 1963 – Influence de la lumière et de la température sur la germination. *Thèse Doct. (Etat) Sc. nat.*, Paris.

RÖMISCH H., 1960 – Kolorimetrische Bestimmung des Rutingehalts in Pflanzenextrakten und Präparaten mit Aluminium chloridi mit Eisessig Pyridin gepuffneter Lösung. *Pharmazie*, **15**, 33-38.

SALE P.J.M. et VINCE D., 1963 – Some effects of light on leaf growth in *Pisum sativum* and *Tropaeolum majus*. *Photochem. Photobiol.*, **2**, 401-405.

SALE P.J.M., VINCE D. et PRUE J.E., 1964 – Kinetics of the photo-inhibition of stem growth in *Pisum sativum* and *Tropaeolum majus*. *Photochem. Photobiol.*, **3**, 61-65.

SHIBATA K., NAGA I. et KISHIDA M., 1916 – The occurrence and physiological significance of flavone derivatives in plants. *J. biol. Chem.*, **28**, 93-108.

SIEGELMAN H.W., 1964 – Physiological studies on phenolic substances. In *Biochemistry of phenolic compounds*, J.B. HARBORNE éd., Acad. Press, New York et Londres p. 445.

SIEGELMAN H.W. et BUTLER W.L., 1965 – Properties of phytochrome. *Annual. Rev. Plant. Physiol.*, **16**, 383-392.

SKARZINSKI B., 1939 – Spektrographische Untersuchungen von Flavonfarbstoffen. *Biochem. Z.*, **301**, 150-169.

SOMOGYI M., 1937 – A reagent for the copper-iodometric determination of very small amounts of sugar. *J. biol. Chem.*, **117**, 771-776.

SONDHEIMER E., 1964 – Chlorogenic acids and related depsides. *Bot. Review*, **18**, 667-712.

SPRECHER E., 1956 – Beiträge zur Frage der Biogenese sekundärer Pflanzenstoffe der Weinkraute (*Ruta graveolens* L.) *Planta*, **47**, 323-358.

STAFFORD H.A., 1965 – Flavonoids and related phenolic compounds produced in the first internode of *Sorghum vulgare*. Pers. in darkness and in light. *Plant. Physiol.*, **40**, 130-138.

TRONCHET J., 1965 – Les flavonoïdes d'*Aristolochia Sipho* L. feuilles, tiges jeunes volubiles et tiges âgées. *Ann. Sci. Univ. Besançon*, **3**, 12-23.

URBAN R., 1959 – Physiologische Untersuchungen über einige Flavonoid und Oxyzimtsaüren II Mitt. Untersuchungen über den jahreszeitlichen und tagesperiodischen Verlauf der Stoffbildung. *Planta*, **52**, 565-582.

ZEEUW D. DE et LEOPOLD A.C., 1957 – The prevention of auxin responses by ultra-violet light. *Amer. J. Bot.*, **44**, 225-230.

ZUCKER M., NITSCH C. et NITSCH J.P., 1965 – The induction of flowering in *Nicotiana*. II Photoperiodic alteration of the chlorogenic acid concentration. *Amer. J. Bot.*, **52**, 271-277.

JULIA M.	T	Etude des molécules naturelles complexes.
MAGAT	T	Physico-chimie des rayonnements.
Mlle QUINTIN .	T	Electrochimie.
MONOD	T	Chimie du métabolisme.
DE POSSEL ...	T	Analyse numérique.
CHARLOT	T	Chimie analytique.
CHATELET	T	Chimie C.P.E.M.
MATTLER	T	Physique S.P.C.N.
BOUISSIÈRES ..	T	Radiochimie.
Mme COUTURE	T	Thermodynamique et mécanique physique.
FRANC	T	Biologie animale C.P.E.M.
SCHNELL	T	Botanique tropicale.
STOLKOWSKI ..	T	Physiologie générale.
ACHER	T	Chimie biologique.
BAUDOIN	T	Biologie animale C.P.E.M.
BEAUMONT ...		Biologie animale S.P.C.N.
BLAMONT		Géophysique ionosphère.
BOUREAU	T	Botanique.
CURIE D.	T	Physique M.G.P.
DURAND-DELGA	T	Géologie.
HELLER	T	Physiologie végétale.
TORTRAT	T	Calcul des probabilités.
CAILLEUX	T	Géologie S.P.C.N.
MAGNAN		Physique électricité.
DAUDEL	T	Mécanique ondulatoire.
Mlle FOURCROY		Biologie végétale S.P.C.N.
Mme CHOQUET-BRUHAT		Mécanique analytique et mécanique céleste.
Mlle VEIL	T	Physiologie générale.
LWOFF	T	Microbiologie.
SIESTRUNCK ..	T	Mécanique physique et expérim.
CABANNES	T	Mécanique générale.
CAIRE	T	Géographie physique et géologie dynamique.
COMOLET		Mécanique des fluides.
DELLOUE	T	Physique de l'exosphère.
HOUILLON		Biologie animale C.P.E.M.
OLIVIER		Anthropologie.
SAMUEL	T	Mathématiques (E.N.S. Jeunes filles).
THIRY	T	Mécanique céleste.
ABELES	T	Physique S.P.C.N.
AMAT	T	Thermodynamique.
AUBOIN	T	Géologie.
Mme BENOIT-GUEUTAL ..	T	Physique nucléaire et radioactivité.
BOUGIS		Biologie végétale marine Villefranche-sur-Mer.
RIGAUDY	T	Chimie S.P.C.N.
COLLONGUES ..		Chimie C.P.E.M.
DUBERT		Biochimie.
NOZIÈRES		Physique générale.
CADIOT		Chimie organique.
IVANOFF		Océanographie physique.
FRANÇOIS		Zoologie.
TALBOT		Génie chimique.
Mme NOUGAREDE		Botanique.
BRUHAT	T	Mathématique M.P.C.
FOURNET		Electricité générale.
DEHEUVELS ...	T	Mathématiques propédeutique
FURON	T	Géologie S.P.C.N.
Mme GANS ..	T	Génétique.
GENEVES		Biologie végétale C.P.E.M.
HUPE	T	Pétrographie.
HOLLANDE ...	T	Biologie générale.
LIONS	T	Analyse numérique.
MAITTE	T	Chimie organique.
NICOLAS		Géologie appliquée.
PANIGEL		Biologie générale.
RAVIER	T	Pétrographie.
MOREL F.	T	Physiologie comparée.
ROSEAU	T	Mécanique théorique des fluides.
ROUBINE		Electronique E.S.E.
SILBER	T	Chimie C.P.E.M.
UEBERSFELD ..	T	Electronique.
	T	Théories physiques.
HERVE	T	Mathématiques.
Mme PECKER-WIMEL	T	Astrophysique.
BALKANSKI ...		Physique M.P.C.
LE CORRE	T	Electricité.
NATAF	T	Physique nucléaire et radioactivité.
ECHALIER		Biologie animale C.P.E.M.
BARRAUD	T	Physique C.P.E.M.
DARS		Géologie structurale et appliquée.
CAMEFORT	T	Botanique (agrégation).
VICHNIEWSKY .	T	Mécanique industrielle.
SIGWALT	T	Chimie S.P.C.N.
BLAQUIÈRE ...		Electronique.
BARUCH		Physique propédeutique.
ARNOUS	T	Physique théorique.
SLONIMSKI		Génétique.
MALLIAVIN ...	T	Mathématiques propédeutique.
GAUDEMAR ...		Chimie propédeutique.
BROUSSE	T	Mécanique théorique.
ROSCH	T	Astronomie.
GUY	T	Physique expérimentale.
LAZARD		Mathématiques M.P.C.
MOREL P.		Physique M.P.C.
ARSAC		Programmation.
LEFEBVRE		Chimie M.P.C.
BOK		Physique propédeutique.
CHAPEVILLE ..		Biochimie.
BENOIT		Physique C.P.E.M.
RIO		Chimie C.P.E.M.
JAUZEIN		Géologie E.N.S.
PRÉVOST G. ..		Biologie végétale C.P.E.M.
FAVARD P. ...		Biologie animale C.P.E.M.
Mme CHARNIAUX-COTTON.....		Evolution des êtres organisés.
Mlle FICINI ...		Chimie C.P.E.M.
LEQUEUX		Astronomie.
COHEN TANNOUDJI .		Physique atomique.
TAVERNIER ...		Physique C.P.E.M.
DURAND M. .		Biologie animale S.P.C.N.
PASCAUD		Physiologie.
Mme PETIT ..		Biologie animale C.P.E.M.
CAGNAC		Physique agrégation.
FALK-VAIRANT		Physique nucléaire.
KRASNER	T	Mathématiques.
BENZECRI	T	Statistiques.
VINH MAU ...		Physique M.G.P.
DUQUESNES ...		Physique C.P.E.M.
SCHUTZENBERGER		Programmation.
TRÉMILLON ...		Chimie M.P.C.
FAYARD		Chimie M.P.C.
BUVET		Chimie C.P.E.M.
AUTHIER		Physique M.P.C.
PICINBONO ...	T	Physique C.P.E.M.
BONNEFILLE ..		Electrotechnique.
Mme PUISEUX DAO		Biologie végétale.

Secrétaire général ..... R. POULLAIN

UNIVERSITÉ DE PARIS

FACULTÉ DES SCIENCES D'ORSAY

Janvier 1966

PROFESSEURS

MANGENOT G.	T	Biologie végétale.
JACQUINOT P. .	T	Optique.
GUINIER A. . . .	T	Electricité & physique des solides.
GRIVET P.	T	Electronique.
BLANC-LAPIERRE A.	T	Accélérateur linéaire.
L'HÉRITIER P.	T	Génétique des virus.
LÉMÉE G.	T	Ecologie végétale.
MOYSE A.	T	Physiologie végétale.
DODE M. . . .	T	Chimie thermodynamique.
DENY J.	T	Mathématiques.
RIVIÈRE A. . . .	T	Géologie générale & sédimentologie.
MICHEL A.	T	Chimie minérale.
MAY R.	T	Anatomie comparée.
DELANGE H. . .	T	Mathématiques.
CHAPELLE J. . .	T	Physique expérimentale.
LACOMBE P. . .	T	Métallurgie.
BENOIT P.	T	Physiologie générale.
GUINOCHET J. .	T	Biologie végétale S.P.C.N.
NÉRON A.	T	Mathématiques.
NOZERAN R. . .	T	Botanique approfondie.
CASTAING R. .	T	Thermodynamique.
ELLENBERGER F.	T	Géologie structurale.
LEDERER E. . . .	T	Chimie biologique.
RIZET J.	T	Génétique.
LENDER T. . .	T	Biologie animale S.P.C.N.
POITOU G. . . .	T	Mathématiques.
FRÉON P.	T	Chimie organique.
TONNELAT	T	Biologie physico-chimique.
BRUNN Jan . . .	T	Géologie historique.
JEAN M.	T	Physique nucléaire.
BERGERARD J. .	T	Zoologie.
ROGER J.	T	Paléontologie.
LEFORT M.	T	Chimie nucléaire.
LAGARRIGUE A.	T	Physique des hautes énergies.
JULLIEN J.	T	Chimie structurale organique.
ARNULF A. . . .	T	Optique.
ROUAULT M. .	T	Diffraction électronique.
MARÉCHAL A. .	T	Optique théorique et appliquée.
MAZET R.	T	Mécanique générale.
DAVID S.	T	Chimie agrégation.
GUÉRIN H. . . .	T	Chimie des gaz et des combustibles.
LESIEUR L. . . .	T	Mathématiques M.P.C. et algèbre.
KOURGANOFF . .	T	Astronomie.
ARNOULT P. . .	T	Physique électronique.
KAHANE J.P. . .	T	Mathématiques.
BROCHARD J. .	T	Physique propédeutique.
Mme ROIZEN .	T	Physique C.P.E.M.
BERTEIN F.	T	Electronique.
MALGRANGE B.	T	Mathématiques.
CORABŒUF E. .	T	Physiologie animale.
FRIEDEL J.	T	Physique des solides.
CHEVAUGEON J.	T	Cryptogamie.
MEYER P.	T	Physique théorique & atomique.
LEHMANN P. . .	T	Accélérateur linéaire.
CHABRAL R. . .	T	Physique propédeutique.
DELCROIX J.M.	T	Physique des plasmas.
CERF J.	T	Mathématiques.
D'ESPAGNAT B.	T	Physique théorique.
SCHAEFFER P. .	T	Microbiologie.
DE GENNES P.	T	Physique des solides.
Mme MARTY N.		Physique propédeutique.
GOURDIN M. .		Physique théorique.
PEREZ-Y-JORBA		Physique propédeutique.
GORENFLOT E. .		Biologie végétale S.P.C.N.
RIOU M.		Physique nucléaire.
BROUSSE R. . . .		Géologie S.P.C.N.
LIORET C.		Physiologie végétale.
CLAUSER H. . .		Chimie biologique.
JANCOVICI B. .		Physique atomique.
LURCAT J.		Physique propédeutique.
LE BERRE J. . .		Entomologie.
LAVOREL J. . . .		Biophysique.
PERIO P.		Physique propédeutique.
FETIZON M. . .		Stéréochimie.
CHEMLA M. . .		Chimie des isotopes.
MAZIÈRES C. .		Chimie S.P.C.N.
VILKAS M. . . .		Chimie C.P.E.M.
BLANDIN A. . .		Physique des solides.
BRUN G.		Génétique.
MERCOUROFF .		Physique agrégation.
ANDRÉ J. . . .		Microscopie électronique.
CHEVALLIER F.		Physiologie animale.
Mlle MARCOU		Biologie cellulaire C.P.E.M.
BOURDU R. . . .		Physiologie végétale.
BERKALOFF A.		Biologie animale C.P.E.M.
Mlle LEFORT M.		Biologie cellulaire C.P.E.M.
Mme LAMBERT		Physique C.P.E.M.
BIZOT J.C. . . .		Physique M.P.C.
GUIRAUD J.P. .		Mécanique.
LABOUESSE B. .		Chimie S.P.C.N.

DEUXIÈME THÈSE

PROPOSITIONS DONNÉES PAR LA FACULTÉ

« Les coumarines en physiologie végétale »

Vu et approuvé :

Paris, le 24 février 1967

Le Doyen de la Faculté des Sciences,

Marc ZAMANSKY

VU

et Permis d'imprimer :

Le Recteur de l'Académie de Paris,

Jean ROCHE